

16/PRAS

/539450

JC20 Rec'd PCT/PTO 20 JUN 2005

明細書

$\beta$  1, 3-N-アセチル-D-ガラクトサミン転移酵素タンパク質及びそれをコードする核酸、並びにそれを用いた癌化検定方法

5 技術分野

本発明は、新規な  $\beta$  1, 3-N-アセチル-D-ガラクトサミン転移酵素タンパク質及びこれをコードする核酸、並びにそれを用いた癌化検定方法等に関する。

背景技術

10 近年、生体内での糖鎖や複合糖質の働きが注目されている。例えば、血液型を決定する因子は糖タンパク質であり、また神経系の働きに関与しているのは糖脂質である。従って、糖鎖を合成する働きのある酵素は、様々な糖鎖がもたらす生理活性を解析する上で極めて重要な手がかりとなる。

15 例えば、N-アセチル-D-ガラクトサミン（以下、「GalNAc」とも記述する）等はグリコサミノグリカンの構成成分であると共に、スフィンゴ糖脂質、ムチン型糖鎖と様々な糖鎖構造に存在する糖残基である。従って、GalNAcを転移する酵素は、生体内の様々な組織で働く糖鎖の働きを解析する上で極めて重要なツールとなる。

20 上述のように生体内での糖鎖の働きが注目されているが、生体内での糖鎖合成の解析は十分に進んでいるとは言えない。糖鎖合成のメカニズム、生体内での糖合成の局在が十分に解析されていないことも一因である。糖鎖合成のメカニズムを解析するに当たっては、糖鎖合成酵素、特に糖転移酵素を解析し、その酵素を使っていかなる糖鎖が合成されるのかを分析する必要がある。そのために新たな糖転移酵素を探索し、その機能を解析することについての要請は高い。

25 ところで、GalNAcを転移する活性を有する糖転移酵素については幾つか報告例がある（非特許文献1～4）。例えば、ヒトのGalNAc転移酵素の中で、GalNAcを「 $\beta$  1, 4結合」で転移する酵素は公知であり（非特許文献1）、また、GalNAcを $\beta$  1, 3結合（本明細書において「 $\beta$  1, 3」ないし「 $\beta$  3」とは、受容体基質が有する糖残基1位の $\alpha$ -水酸基と、そこに転移して結合する

糖残基 3 位の水酸基との間のグリコシド結合を示す) で転移する酵素としては、  
「ガラクトース」をその受容体基質とする酵素が公知である (非特許文献 2)。

他方で、ヒトのような高等生物において、GalNAc を「 $\beta$  1, 3 結合」で「N-アセチルグルコサミン (以下、「GlcNAc」) とも記述する)」へ転移する酵素  
5 は知られていない。

GalNAc と GlcNAc とが  $\beta$  1, 3 で結合した糖鎖構造は、節足動物であるハエ  
の中性糖脂質上の糖鎖中に確認されたとの報告 (非特許文献 5) はあるが、そも  
そも、哺乳動物、特にヒトにおいてそのような糖鎖構造は存在しないものと信じ  
られていた。

10 特許文献 1

国際特許出願公開第 0 1 / 7 9 5 5 6 号公報

非特許文献 1

Cancer Res. 1993 Nov 15; 53(22):5395-400: Yamashiro S, Ruan S,  
Furukawa K, Tai T, Lloyd KO, Shiku H, Furukawa K. Genetic and enzymatic  
15 basis for the differential expression of GM2 and GD2 gangliosides in  
human cancer cell lines.

非特許文献 2

Biochim Biophys Acta. 1995 Jan 3; 1254(1):56-65: Taga S, Tetaud C,  
Mangeney M, Tursz T, Wiels J. Sequential changes in glycolipid  
20 expression  
during human B cell, differentiation: enzymatic bases.

非特許文献 3

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 1; 93(20):10697-702: Haslam DB,  
Baenziger JU. Related Articles, Links, Expression cloning of Forssman  
25 gly colipid synthetase: a novel member of the histo-blood group ABO  
gene family.

非特許文献 4

J Biol Chem. 1997 Sep 19; 272(38): 23503-14: Wandall HH, Hassan H,  
Mirgorodskaya E, Kristensen AK, Roepstorff P, Bennett EP, Nielsen PA,

Hollingsworth MA, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Clausen H.  
Substrate specificities of three members of the human, UDP-N-acetyl-  
alpha-D-galactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase  
family, GalNAc-T1, -T2, and -T3.

5 非特許文献 5

J. Biochem. (Tokyo) 1990 June; 107(6); 899-903: Sugita M. Inagaki F,  
Naito H, Hori T., Studies on glycosphingolipids in larvae of the  
green-bottle fly, *Lucilia caesar*: two neutral glycosphingolipids  
having large straight oligosaccharide chains with eight and nine  
sugars.

10 発明の開示

本発明は、哺乳類、特にヒト由来の糖転移酵素であつて、GalNAc を  $\beta$  1,  
3 結合で GlcNAc へ転移する新規な転移活性を有するポリペプチド、及びをその  
ようなポリペプチドをコードする核酸等を提供するという課題を解決する。

15 更に本発明は、該核酸を宿主細胞内で発現する形質転換体、及び当該形質転換  
体に当該タンパク質を産生させて回収するその製造方法、並びに該タンパク質を  
認識する抗体を提供するという課題も解決する。

他方、糖鎖合成は癌化に伴って変化する場合があることから、そのような糖鎖  
合成酵素の同定と発現解析は癌診断などに有用な指標を提供すると期待される。

20 本発明は、癌化や悪性度に相関して変動するそのようなタンパク質の転写レベル  
について組織や細胞系統レベルで解析及び比較を行うことにより、癌化検定等に  
役立つ具体的な手法と判断基準をも提供する。

図面の簡単な説明

25 図 1 は、本実施例に係る G34 酵素タンパク質の反応時間に対する活性変化を  
示す線図である。

図 2 A は、本実施例に係る G34 酵素タンパク質が合成した糖鎖構造を解析す  
るための NMR 測定の結果を示す図である。

図 2 B は、図 2 A の NMR 測定結果の一部を拡大して示す図である。

図3は、図2のNMRにおけるNOEを示す表である。テーブル1のデータに関する諸条件は次の通り：1.08mM、298K、D<sub>2</sub>O、無参照のものはCH<sub>2</sub>（高）＝4.557ppm、\*印のものは化学シフトは1Dスペクトルより、CH<sub>2</sub>（低）＝4.778ppm、フェニル（オルト）＝7.265ppm、フェニル（メタ）＝7.354ppm、フェニル（パラ）＝7.320ppmである。

図4は、図2のNMRに関して各ピラノースの関連データ（暫定NOE）を示す表である（s：強い、m：中間、w：弱い、vw：非常に弱い、A：GlcNAc、B：GalNAc）

図5は、本実施例のG34酵素タンパク質と公知のβ3Gal転移酵素との間で、アミノ酸配列を比較するための図である。

図6は、本実施例のG34酵素タンパク質と公知の各種β3結合糖転移酵素との間で、β3結合活性に関するモチーフを比較するための図である。「b3」はβ1-3結合を示し、「Gn」はGlcNAcを示す。

図7は、本実施例に係るG34酵素タンパク質の活性のpH依存性を示す線図である。

図8は、本実施例に係るG34酵素タンパク質の活性のイオン要求性を示す線図である。

図9は、本実施例に係るG34酵素タンパク質のヒト細胞株における発現量を示すグラフである。

図10は、本実施例のマウスG34のアミノ酸配列（上段）をヒトG34のアミノ酸配列（下段）とアライメントさせた図である。

図11は、本実施例に係るmG34核酸を用いたマウス精巣試料に対するin situ ハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

#### 本発明の詳しい記載

上記課題を解決するために本発明者等は、目的の酵素と類似した作用を有する酵素遺伝子の塩基配列を基に、配列同一性が高いと思われる目的とする核酸の単離と精製を試みた。具体的には、まず、公知の糖転移酵素であるβ3ガラクトース転移酵素6（β3GalT6）の配列をクエリーとしてBLAST検索を行い、その結果、相同性を有する配列を見出した（GenBank No. AX285201）。なお、この塩

基配列は、国際公開第0179556号公報（上記特許文献1）に記載の配列番号1006の配列として公知であったが、その活性は不明であった。

5 先ず本発明者等は、独自にPCRで上記遺伝子をクローニングし、その塩基配列（配列番号1）及び推測アミノ酸配列（配列番号2）を決定し、そして、当該核酸によりコードされるポリペプチドの特定の生物活性を突き止めることに成功し、本発明を完成した。さらに、その配列をクエリーとしてマウス遺伝子の検索を行った結果、配列番号3の塩基配列及びその推測アミノ酸配列（配列番号4）を発見した。

10 配列番号1の塩基配列を有する遺伝子及び配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質をヒトG34と命名し、配列番号3の塩基配列を有する遺伝子及び配列番号4のアミノ酸配列を有するタンパク質をマウスG34と命名した。

15 本発明者等の検討によれば、上記G34タンパク質は、N-アセチル-D-ガラクトサミン残基を供与体基質とし、N-アセチル-D-グルコサミン残基を受容体基質とする。そして、本明細書の実施例2で詳述するように、そのアミノ酸配列中に、 $\beta 1, 3$ の結合形式で種々の糖（例えば、ガラクトース、N-アセチル-D-グルコサミン）を転移させる酵素ファミリーに良く保存されている3つのモチーフを保持していた。これらの観点から、G34タンパク質は、意外なことに、哺乳動物、特にヒトでは従来報告例がない新規な糖鎖構造「GalNAc- $\beta 1, 3$ -GlcNAc」を合成する転移活性を有すると考えられた。その結合形式は実際に  
20 NMRによって確認された。

すなわち、本発明は、N-アセチル-D-ガラクトサミンをN-アセチル-D-グルコサミンに $\beta 1, 3$ 結合で転移する $\beta 1, 3$ -N-アセチル-D-ガラクトサミン転移酵素タンパク質に関する。

本発明の好ましい態様の酵素タンパク質は、下記の性質（a）－（c）：

25 （a）受容体基質の特異性

オリゴ糖を受容体基質とする場合、Bz- $\beta$ -GlcNAc、GlcNAc- $\beta 1-4$ -GlcNAc- $\beta$ -Bz、Gal- $\beta 1-3$ （GlcNAc- $\beta 1-6$ ）GalNAc- $\alpha$ -pNp、GlcNAc- $\beta 1-3$  GalNAc- $\alpha$ -pNp、及びGlcNAc- $\beta 1-6$ GalNAc- $\alpha$ -pNpへの転移活性を示す（「GlcNAc」はN-アセチル-D-グルコサミン残基を示し、「GalNAc」はN-アセチル-D-ガラ

クトサミン残基を示し、「Bz」はベンジル基を示し、「pNp」はパラニトロフェニル基を示し、「-」はグリコシド結合を示す。式中の数字はグリコシド結合が存在する糖環の炭素番号を示し、「 $\alpha$ 」及び「 $\beta$ 」は糖環1位のグリコシド結合のアノマーを示し、5位  $\text{CH}_2\text{OH}$  又は  $\text{CH}_3$  との位置関係がトランスのものを「 $\alpha$ 」、シスのものを「 $\beta$ 」で示す)。

但し、好ましくは、 $\text{Bz}-\alpha\text{-GlcNAc}$  及び  $\text{Gal } \beta 1-3 \text{ GlcNAc}-\beta\text{-pNp}$  への転移活性を実質的に示さない；

(b) 反応 pH

pH 6.2 ~ 6.6 の領域での活性が、他の pH 領域での活性と比較して低い；及び

(c) 二価イオンの要求性

前記活性は、少なくとも  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、又は  $\text{Mg}^{2+}$  の存在下で増強されるが、 $\text{Mn}^{2+}$  による活性の増強は  $\text{Cu}^+$  との共存下ではほぼ完全に消失する；

の少なくとも一つを有するか、又はそれら性質をあらゆる組み合わせで有し得る。

また、前記糖転移酵素タンパク質の好ましい態様は、本発明の糖転移酵素タンパク質は、下記 (A) 又は (B) のポリペプチド：

(A) 配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド；又は

(B) 配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、又は挿入したアミノ酸配列を有し、且つN-アセチル-D-ガラクトサミンをN-アセチル-D-グルコサミンに  $\beta 1, 3$  結合で転移するポリペプチド；

を含む。

また、前記糖転移酵素タンパク質のより好ましい態様は、前記 (A) のポリペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸番号 189 ~ 500 のアミノ酸配列を有するポリペプチドからなる糖転移酵素タンパク質である。また前記糖転移酵素タンパク質のさらに好ましい態様は、前記 (A) のポリペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸番号 36 ~ 500 のアミノ酸配列を有するポリペプチドからなる糖転移酵素タンパク質である。

加えて、本発明の糖転移酵素タンパク質の他の態様には、配列番号 2 に記載のアミノ酸番号 189～500 又は配列番号 4 に記載のアミノ酸番号 35～504 のアミノ酸配列と少なくとも 30% を超える同一のアミノ酸配列、好ましくは少なくとも 40% 同一のアミノ酸配列、より好ましくは少なくとも 50% 同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドからなるタンパク質も含まれる。

本発明は、他の側面において、上記いずれかのポリペプチドをコードする塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる核酸を提供する。

本発明のタンパク質をコードする核酸の好ましい態様は、配列番号 1 又は 3 に記載の塩基配列又は少なくともその何れかに相補的な塩基配列からなる核酸である。より好ましくは、ヒト由来では配列番号 1 に記載の塩基番号 565～1503 の塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる核酸、最も好ましくは、配列番号 1 に記載の塩基番号 106～1503 の塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる核酸であり、マウス由来では配列番号 3 に記載の塩基番号 103～1512 の塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる核酸である。

本発明による前記核酸の態様には DNA が含まれる。

さらに本発明は、前記いずれかの核酸を含むベクター、該ベクターを含む形質転換体をも提供する。

更なる他の側面において本発明は、 $\beta$ 1, 3-N-アセチル-D-ガラクトサミン転移酵素タンパク質の製造方法であって、前記形質転換体を生育させ、前記糖転移酵素タンパク質を発現させ、該生育体から該糖転移酵素タンパク質を回収することを含む製造方法を提供する。

更なる他の側面において本発明は、前記いずれかの  $\beta$ 1, 3-N-アセチル-D-ガラクトサミン転移酵素タンパク質を認識する抗体を提供する。

他方において、本発明者は、上記 G34 の発見に伴い、その mRNA の発現量が癌化した組織及び細胞株において有意に上昇していることを明らかにした。

したがって、本発明は、癌化又は悪性度の指標として有用な核酸であって、配列番号 1 又は 3 に記載の塩基配列、又は少なくともその何れか一方に相補的な塩基配列に対し、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする測定用核酸をも提供する。

本発明の測定用核酸は、典型的には、配列番号 1 又は 3 に記載の塩基配列中の少なくとも十数個の連続する塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなることができる。

本発明の測定用核酸の好ましい態様には、配列番号 1 6 に記載の塩基配列、又はそれに相補的な塩基配列からなるプローブ、並びに、下記 (1) 又は (2) の塩基配列からなるプライマーセット：

(1) 配列番号 1 4 と配列番号 1 5 に記載の一組の塩基配列；

(2) 配列番号 1 7 と配列番号 1 8 に記載の一組の塩基配列；

が含まれる。

また、本発明の測定用核酸は、癌マーカーとして利用されることができる。

さらに本発明は、生物試料の癌化を検定する方法であって、

(a) 上記いずれかの核酸を使用して、生物試料における該核酸についての転写レベルを測定し；そして

(b) 該測定値が、健常生物試料についての測定値と比較して有意に上回るか否かを判断すること；  
を含む方法をも提供する。

本発明の癌化検定方法の好ましい態様は、前記転写レベルの測定が、上記生物試料を対象とし、上記いずれかの核酸を使用したハイブリダイゼーション法又は PCR 法を含む。

本発明の癌化検定方法の更なる側面において、癌治療に関する処置の有効性を検定する方法であって、上記いずれかの核酸を使用して、癌治療のための処置が施される生物試料における該核酸についての転写レベルを測定し、該測定値がその処置前又は未処置の場合と比較して有意に下回るか否かを判断することを含む方法が提供される。

前記生物試料は、特に大腸又は肺に由来する試料であることができる。

#### 発明の実施形態

以下、本発明の実施形態を詳細に説明する。

(1) 本発明の G34 酵素タンパク質をコードする核酸

本発明者等は、上述の発見に基づき、該核酸にコードされている G34 酵素タ



ンパク質を発現させ、これを単離及び精製し、さらにその酵素活性を特定した。  
ここで、目的の酵素活性を有するアミノ酸配列が特定されたという事実に着目すれば、配列番号 1 又は 3 の塩基配列は、当該酵素活性を有する単離ポリペプチドをコードする核酸の一態様である。すなわち、本発明の核酸には、有限数ではあるが、当該 G34 酵素タンパク質のアミノ酸配列へ縮重するような、該同一のアミノ酸配列をコードし得るあらゆる核酸が含まれる。

また、本発明は、上記のような新規なアミノ酸配列からなるポリペプチド全長またはその断片をコードする核酸を提供する。そのような新規ポリペプチドをコードする典型的な核酸は、配列番号 1 又は 3 に記載の塩基配列又は少なくともその何れか一方に相補的な塩基配列を有する。

また、本発明の核酸は、一本鎖及び二本鎖型両方の DNA、及びその RNA 相補体も含む。DNA には、例えば、天然由来の DNA、組換え DNA、化学結合した DNA、PCR によって増幅された DNA、及びそれらの組み合わせが含まれる。但し、ベクターや形質転換体の調製時に安定であるとの観点から、DNA であることが好ましい。

本発明の核酸は、例えば以下の方法により調製することができる。

まず、GenBank No. AX285201 の公知配列又はその一部を利用し、ハイブリダイゼーションや核酸増幅反応等の遺伝子工学の基本的手法を用いて cDNA ライブラリーから常法に従って核酸増幅反応を行い、これにより本発明の核酸をクローニングすることができる。その核酸は、例えば、PCR 産物として約 1.5kbp の DNA 断片が得られるので、これを例えばアガロースゲル電気泳動等の分子量により DNA 断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って単離することができる。

また、単離された核酸の推測アミノ酸配列（配列番号 2 又は 4）によれば、N 末端に疎水性膜貫通領域を有すると予測されるので、この膜貫通領域を有しないポリペプチドをコードする塩基配列の領域を調製することにより、可溶化形態のポリペプチドをコードする本発明の核酸も得ることができる。

本願に開示された核酸の塩基配列に基づき、当業者であれば目的の核酸又は調製すべきその一領域の、両端に位置する塩基配列を基に適宜プライマーを作成し

、それを用いた核酸増幅反応によって目的の領域を増幅して調製することが容易である。

上記核酸増幅反応には、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) [Saiki R. K., et al., Science, 230, 1350-1354 (1985)]、ライゲース連鎖反応 (LCR) [Wu D. Y., et al., Genomics, 4, 560-569 (1989); Barringer K. J., et al., Gene, 89, 117-122 (1990); Barany F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 189-193 (1991)] 及び転写に基づく増幅 [Kwoh D. Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1173-1177 (1989)] 等の温度循環を必要とする反応、並びに鎖置換反応 (SDA) [Walker G. T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 392-396 (1992); Walker G. T., et al., Nuc. Acids Res., 20, 1691-1696 (1992)]、自己保持配列複製 (3SR) [Guatelli J. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1874-1878 (1990)] および Q  $\beta$  レプリカゼシステム [リザイルディら、BioTechnology 6, p.1197-1202 (1988)] 等の恒温反応が含まれる。また、欧州特許第 0525882 号に記載されている標的核酸と変異配列の競合増幅による核酸配列に基づく増幅 (Nucleic Acid Sequence Based Amplification: NASABA) 反応等も利用可能である。好ましくは PCR 法である。

本発明の核酸を利用することによって、後述のように目的の酵素タンパク質を発現させることもできるし、医学研究又は遺伝子治療等の目的でプローブやアンチセンスプライマーを提供することもできる。

また当業者であれば、配列番号 1 又は 3 の塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列からなる核酸を調製することにより、配列番号 1 又は 3 の配列と同等に有用な核酸を取得できる。例えば、本発明の相同な核酸には、配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列に対して相同性を有し、且つ N-アセチル-D-ガラクトサミンを N-アセチル-D-グルコサミンに  $\beta$  1, 3 結合で転移する活性を有するタンパク質をコードする核酸が含まれ得る。

本発明のそのような相同タンパク質をコードする核酸の範囲を特定するに当たり、本発明の配列番号 1 又は 3 に記載の核酸配列について同一性検索を行うと、該核酸配列は、最もホモロジーの高い公知の  $\beta$  1, 4GalNAc 転移酵素 (上記非

特許文献 1) の核酸配列とは 40% の同一性を有し、また最もホモロジーの高い公知の  $\beta$  1, 3Gal 転移酵素の核酸配列とも 40% の同一性を有する (上記非特許文献 2)。これらの観点から、本発明の相同タンパク質をコードする好適な核酸配列は、典型的には配列番号 1 又は 3 中の全塩基配列、好ましくは配列番号 1 の塩基番号 106 ~ 1503 からなる部分塩基配列、好ましくは配列番号 3 の塩基番号 103 ~ 1512 からなる部分塩基配列、又はそれらに相補的な塩基配列のいずれかに対し、40% を超える同一性、より好ましくは少なくとも 50% の同一性、特に好ましくは少なくとも 60% の同一性を有する。

また、配列番号 1 と配列番号 3 とに記載の塩基配列同士では 86% の同一性を有する。この観点から、本発明の相同タンパク質をコードする好適な核酸配列は、配列番号 1 中の全塩基配列、好ましくは塩基番号 106 ~ 1503、又はそれらに相補的な塩基配列のいずれかに対し、少なくとも 86%、好ましくは 90% の同一性を有すると定義することもできる。

上記の同一性パーセントは、視覚的検査および数学的計算によって決定することが可能である。あるいは、2 つの核酸配列の同一性パーセントは、Devereux ら, Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984 に記載され、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ (UWGC G) より入手可能な GAP コンピュータープログラム、バージョン 6.0 を用いて、配列情報を比較することによって、決定可能である。GAP プログラムの好ましいデフォルトパラメーターには：

(1) ヌクレオチドに関する単一 (unary) 比較マトリックス (同一に対し 1 および非同一直し 0 の値を含む)、並びに Schwartz 及び Dayhoff 監修, Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 353-358, National Biomedical Research Foundation, 1979 に記載されるような、Gribskov 及び Burgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986 の加重比較マトリックス；(2) 各ギャップに対する 3.0 のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに 0.10 のペナルティ；及び (3) 末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、使用可能である。

また、本発明の構造遺伝子として相同な他の核酸には、典型的には配列番号 1 又は 3 中の塩基配列、好ましくは配列番号 1 の塩基番号 106 ~ 1503 からな

る塩基配列、好ましくは配列番号 3 の塩基番号 103～1512 からなる塩基配列、又はそれらに相補的な塩基配列からなるヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ N-アセチル-D-ガラクトサミンを N-アセチル-D-グルコサミンに  $\beta$  1, 3 結合で転移する活性を有するポリペプチドをコードする核酸も含まれる。

ここでストリンジェントな条件下とは、中程度又は高程度のストリンジェント条件下でハイブリダイズすることを意味する。具体的には、中程度のストリンジェントな条件は、例えば、DNA の長さに基づき、一般の技術を有する当業者によって、容易に決定することが可能である。基本的な条件は、Sambrook ら、

Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第 3 版、Vol. 1、7.42-7.45 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 に示され、そしてニトロセルロースフィルターに関し、5×SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH8.0) の前洗浄溶液、約 40-50℃での、約 50%ホルムアミド、2×SSC-6×SSC (又は約 42℃での約 50%ホルムアミド中の、スターク溶液 (Stark's solution) などの他の同様のハイブリダイゼーション溶液) のハイブリダイゼーション条件、および約 60℃、0.5×SSC、0.1% SDS の洗浄条件の使用が含まれる。高ストリンジェントな条件もまた、例えば DNA の長さに基づき、当業者によって、容易に決定することが可能である。一般的に、こうした条件は、中程度にストリンジェントな条件よりも高い温度及び／又は低い塩濃度でのハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を含み、例えば上記のようなハイブリダイゼーション条件、及びおよそ 68℃、0.2×SSC、0.1% SDS の洗浄を伴うと定義される。当業者は、温度および洗浄溶液塩濃度は、塩基配列の長さ等の要因に従って、必要に応じて調整可能であることを認識するであろう。

上記のように当業者であれば、当該技術分野において公知のハイブリダイゼーション条件に関する技術常識、並びに通常用いられる実験手段を通じて得られるであろう経験則を基に、適切に中程度又は高程度であるストリンジェントな条件を容易に設定し、実施することができる。

## (2) 本発明のベクター及び形質転換体

本発明によれば、上記核酸を含む組換えベクターが提供される。プラスミド等

のベクターに該核酸の DNA 断片を組み込む方法としては、例えば、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.1 (2001)に記載の方法などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット（例えば、宝酒造製等）を用いるとよい。

- 5      上記のようにして得られた組換えベクター（例えば、組換えプラスミド）は、宿主細胞（例えば、大腸菌 DH5 $\alpha$ 、TB1、LE392、又は XL-LE392 又は XL-1Blue 等）に導入される。プラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 16.1 (2001)に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃などを用いる方法などが挙げられる。

- 15      使用可能なベクターは、簡単には当業界において入手可能な組換え用ベクター（例えば、プラスミド DNA 等）に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。用いられるベクターの具体例としては、大腸菌由来のプラスミドとして、例えば、pDONR201、pBluescript、pUC18、pUC19、pBR322 等が例示されるが、これらに限定されない。

- 20      当業者であれば、制限末端は発現ベクターに適合するように適宜選択することが可能である。発現ベクターは、本発明の酵素を発現させたい宿主細胞に適したものを当業者であれば適宜選択することができ、上記核酸が目的の宿主細胞中で発現しうるように遺伝子発現に関与する領域（プロモータ領域、エンハンサー領域、オペレーター領域等）が適切に配列されて、該核酸が適切に発現するように構築されていることが好ましい。

- 25      発現ベクターの種類は、原核細胞及び／又は真核細胞の各種の宿主細胞中で所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌用発現ベクターとして、pQE-30、pQE-60、pMAL-C2、pMAL-p2、pSE420 などが好ましく、酵母用発現ベクターとして pYES2（サッカロマイセス属）、pPIC3.5K、pPIC9K、pAO815（以上ピキア属）、昆虫用発現ベクターとして pFastBac、pBacPAK8/9、pBK283、pVL1392、pBlueBac4.5

などが好ましい。

発現ベクターの構築は、制限処理及び連結作業を必要としない Gateway システム（インビトロジェン社）を用いるとよい。Gateway システムとは、PCR 産物の方向性を維持したままクローニングができ、また、DNA 断片を適切に改変した発現ベクターにサブクローニングを可能にした部位特異的な組換えを利用したシステムである。具体的には、PCR 産物とドナーベクターとから部位特異的な組換え酵素である BP クロナーゼによってエントリークローンを作成し、その後、このクローンと別の組換え酵素である LR クロナーゼによって組換え可能なデスティネーションベクターに PCR 産物を移入することにより、発現系に対応した発現クローンを調製するものである。最初にエントリークローンを作成すれば、制限酵素やリガーゼで作業する手間の係るサブクローニングステップが不要である点を特徴の一つとする。

本発明の核酸を含む上記発現ベクターを宿主細胞に組み込めば、本発明のポリペプチドを産生するための形質転換体を得ることができる。形質転換体を得るための宿主細胞は、一般に真核細胞（哺乳類細胞、酵母、昆虫細胞等）でもよいし、原核細胞（大腸菌、枯草菌等）でもよい。また、ヒト（例えば、HeLa、293T、SH-SY5Y）、マウス（例えば、Neuro2a、NIH3T3）等由来の培養細胞でもよい。これら宿主細胞はいずれも公知であり、市販されているか（例えば、大日本製薬社）、あるいは公共の研究機関（例えば、理研セルバンク）より入手可能である。あるいは、胚、器官、組織若しくは非ヒト個体も使用可能である。

ところで、本発明の核酸はヒトゲノムライブラリーから発見されものであるから、真核細胞を宿主細胞として用いることより天然物に近い性質を有する本発明の G34 酵素タンパク質（例えば糖鎖が付加された態様など）が得られると考えられる。この観点からは、宿主細胞として真核細胞、特に哺乳類細胞を選択することが好ましい。具体的な哺乳類細胞としては、マウス由来、動物細胞としてはマウス由来、アフリカツメガエル由来、ラット由来、ハムスター由来、サル由来またはヒト由来の細胞若しくはそれらの細胞から樹立した培養細胞株などが例示される。また、宿主細胞としての大腸菌、酵母又は昆虫細胞は、具体的には、大

腸菌 (DH5  $\alpha$ 、M15、JM109、BL21 等)、酵母 (INVSc1 (サッカロマイセス属)、GS115、KM71 (以上ピキア属) など)、昆虫細胞 (Sf21、BmN4、カイコ幼虫等) などが例示される。

5 一般に発現ベクターは、少なくとも、プロモーター、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、およびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化や T4 DNA リガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当な DNA フラグメント (例えば、リンカー、他の制限酵素部位など) を用いることができる。宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは、少なくとも、プロモーター/オペレーター領域、  
10 開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターおよび複製可能単位から構成される。宿主細胞として酵母、植物細胞、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、一般に発現ベクターは、少なくとも、プロモーター、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミ  
15 ネーターを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードする DNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の 5' 側および 3' 側の非翻訳領域、選択マーカー領域または複製可能単位などを適宜含んでもよい。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全 DNA 配列を複製することができる能力をもつ DNA を意味し、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド (天然のプラスミドから調製されたプラスミド) および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coli ではプラスミド pQE30、pET 又は pCAL 若しくはそれらの人工的修飾物 (pQE30、pET 又は pCAL を適当な制限酵素で処理して得られる DNA フラグメント) が、酵母ではプラスミド pYES2 若しくは pPIC9K が、また昆虫細胞ではプラスミド pBacPAK8/9 等があげられる。

25 本発明のベクターの好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン (ATG) が例示される。また、終止コドンとしては、常用の終止コドン (例えば、TAG、TGA、TAA など) が例示される。また、エンハンサー配列、ターミネーター配列については、例えば、それぞれ SV40 に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシンもしくはネオマイシン、ハイグロマイシンまたはスペクチノマイシン等の抗生物質耐性遺伝子などが例示される。

- 5 本発明による発現ベクターの宿主細胞への導入（形質転換又は形質移入とも称される）は、従来公知の方法を用いて行うことができる。細菌（*E. coli*, *Bacillus subtilis* 等）の場合、例えばCohenらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 [Mol. Gen. Genet., 168, 111 (1979)] やコンピテント法 [J. Mol. Biol., 56, 209 (1971)] によって、  
10 *Saccharomyces cerevisiae* の場合は、例えばHinnenらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1927 (1978)] やリチウム法 [J. B. Bacteriol., 153, 163 (1983)] によってそれぞれ形質転換することができる。植物細胞の場合は、例えばリーフディスク法 [Science, 227, 129 (1985)]、エレクトロポレーション法 [Nature, 319, 791 (1986)] によって、動物細胞の場合は、例えば  
15 Grahamの方法 [Virology, 52, 456 (1973)]、昆虫細胞の場合は、例えばSummerらの方法 [Mol. Cell Biol., 3, 2156-2165 (1983)] によってそれぞれ形質転換することができる。

### (3) 本発明のG34酵素タンパク質

- 後述の実施例で例証されたとおり、例えば、配列番号1又は3の塩基配列を有する核酸を発現ベクターに組み込み、それを発現させることで、新規な酵素活性を有するポリペプチドを単離及び精製することができる。  
20

第1に、上記の観点から、本発明のタンパク質の典型的な態様は、配列番号2又は4の推定アミノ酸配列からなる単離されたG34酵素タンパク質である。この酵素タンパク質は、具体的には下記の活性を有する。

### 25 触媒反応

「N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc)」を、その供与体基質から「N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc)」を含む受容体基質へ転移させることができる。そのアミノ酸配列中のモチーフ配列に関する検討から、当該N-アセチルガラクトサミンとN-アセチルグルコサミンとの間の結合形式は、 $\beta$

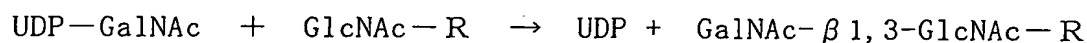


1, 3 グリコシド結合である (実施例 2 参照)。

供与体基質特異性:

前記 N-アセチル-D-ガラクトサミン供与体基質には、N-アセチルガラクトサミンを有する糖ヌクレオチド、例えば、ウリジン二リン酸-N-アセチルガラクトサミン (UDP-GalNAc) アデノシン二リン酸-N-ガラクトサミン (ADP-GalNAc)、グアノシン二リン酸-N-アセチルガラクトサミン (GDP-GalNAc)、及びシチジン二リン酸-N-アセチルガラクトサミン (CDP-GalNAc) 等が含まれる。典型的な供与体基質は、UDP-GalNAc である。

すなわち、本発明の G34 酵素タンパク質は、次式の反応を触媒する。



(R は、当該 GlcNAc 残基を有する糖タンパク質、糖脂質、オリゴ糖、又は多糖等である)

受容体基質特異性:

前記 GalNAc の受容体基質は、N-アセチル-D-グルコサミンであり、典型的には、糖タンパク質、糖脂質、オリゴ糖、又は多糖等の N-アセチル-D-グルコサミン残基である。

また、下記実施例 1 で得られたヒト G34 タンパク質 (典型的には、配列番号 2 のアミノ酸番号 36 からその C 末端までの領域を有する) は、オリゴ糖を受容体基質とする場合、Bz- $\beta$ -GlcNAc、GlcNAc- $\beta$ 1-4-GlcNAc- $\beta$ -Bz, pNp-core2 (core2 = Gal- $\beta$ 1-3-(GlcNAc- $\beta$ 1-6) GalNAc- $\alpha$ -pNp; 以下同様)、pNp-core3 (core3 = GlcNAc- $\beta$ 1-3 GalNAc- $\alpha$ -pNp; 以下同様) 及び pNp-core6 (core6 = GlcNAc- $\beta$ 1-6-GalNAc- $\alpha$ -pNp; 以下同様) への転移活性を示す。好ましくは、Bz- $\alpha$ -GlcNAc 及び Gal- $\beta$ 1-3 GlcNAc- $\beta$ -pNp への転移活性を示さない。更にそれら活性を比較すると、pNp-core2 及び Bz- $\beta$ -GlcNAc への転移活性が非常に高く、特に pNp-core2 への転移活性が最も高い。GlcNAc- $\beta$ 1-4-GlcNAc- $\beta$ -Bz、pNp-core3 及び pNp-core6 への転移活性は比較的低い。

また、下記実施例 4 で得られたマウス G34 タンパク質 (典型的には、配列番号 4 中のアミノ酸番号 35 からその C 末端までの活性領域を有する) は、Bz- $\beta$ -GlcNAc、pNp- $\beta$ -Glc、GlcNAc- $\beta$ 1-4-GlcNAc- $\beta$ -Bz、pNp-core2、pNp-core3

及び pNp-core6 への転移活性を示す。それら活性を比較すると、Bz- $\beta$ -GlcNAc について転移活性が最も高く、ついで core2-pNp、core6-pNp、core3-pNp、pNp- $\beta$ -Glc、GlcNAc- $\beta$ 1-4-GlcNAc- $\beta$ -Bz の順に転写活性が下がる。

なお本明細書において、「GlcNAc」はN-アセチル-D-グルコサミン残基を示し、「GalNAc」はN-アセチル-D-ガラクトサミン残基を示し、「Glc」はグルコサミン残基、「Bz」はベンジル基を示し、「pNp」はパラニトロフェニル基を示し、「oNp」はオルトニトロフェニル基を示し、「-」はグリコシド結合を示す。式中の数字は前記グリコシド結合が存在する糖環の炭素番号を示す。また「 $\alpha$ 」及び「 $\beta$ 」は糖環1位の前記グリコシド結合のアノマーを示し、5位CH<sub>2</sub>OH又はCH<sub>3</sub>との位置関係がトランスのものを「 $\alpha$ 」、シスのものを「 $\beta$ 」で示す)。

#### 至適緩衝液及び至適 pH (表 3 及び図 4) :

ヒト G34 タンパク質に関する検討によると、至適緩衝液としては、MES (2-モルフォリノエタンスルホン酸) 緩衝液、カコジル酸ナトリウム緩衝液、又は HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) 緩衝液のいずれにおいても上記触媒作用を有する。

各緩衝液における活性の pH 依存性は、MES 緩衝液において、少なくとも pH 5.50~pH 5.78 付近で最も活性が高く、次いで pH 6.75 付近の活性が高い；カコジル酸ナトリウム緩衝液においては、pH 6.2 付近から pH 5.0 付近まで pH が小さくなるのに伴って活性が上昇し pH 5.0 付近で最も活性が高く、また pH 6.2 付近から pH 7.0 付近まで pH 依存的に活性が上昇し pH 7.4 付近でほぼプラトーとなる；HEPES 緩衝液においては、pH 7.4 付近から 7.5 付近までの活性が最も高い。これらの中では、HEPES 緩衝液の pH 約 7.4~約 7.5 で最も強い活性を示す。いずれの緩衝液の場合も、pH 6.2-6.6 の領域での活性が、他の pH 領域での活性と比較して低い。

#### 二価イオンの要求性 (表 4 及び図 5) :

ヒト G34 タンパク質の活性は、二価の金属イオン、特に Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、又は Mg<sup>2+</sup> の存在下で増強される。各金属イオン濃度の活性への影響は、Mn<sup>2+</sup>と Co<sup>2+</sup>によると 5.0 nM 付近まで濃度依存的に上昇しそれ以降でほぼプラトーとなり、Mg<sup>2+</sup>に

よると 2.5 nM 付近まで濃度依存的に上昇しそれ以降ではほぼプラトーとなる。但し、 $Mn^{2+}$ による活性の増強は  $Cu^{+}$ との共存下では完全に消失する。

上述のように本発明の G34 酵素タンパク質は、上記所定の酵素反応条件下で GalNAc 残基を GlcNAc 残基に  $\beta$  1-3 グリコシド結合で転移させることができ、糖タンパク質、糖脂質、オリゴ糖、又は多糖等へのそのような糖鎖合成ないし修飾反応に有用である。

第 2 に、本明細書において、上記酵素タンパク質の 1 次構造を代表する配列番号 2 及び 4 に記載のアミノ酸配列が開示されたことで、これらアミノ酸配列に基づき当該技術分野の周知の遺伝子工学的手法により産生され得るあらゆるタンパク質（以下、「変異タンパク質」ないし「修飾タンパク質」とも記述する）が提供される。すなわち、本発明の酵素タンパク質は、当該技術分野の技術常識によれば、クローニングされた核酸の塩基配列から推定される配列番号 2 及び 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質のみに限定されず、下記で説示されるように、例えば、アミノ酸配列 N 末端側等が部分的に欠失した不完全長のポリペプチドからなるタンパク質、或いはそれらアミノ酸配列に相同なタンパク質であって、当該タンパク質の生来的な特性を有するタンパク質をも含まれると意図される。

先ず、本発明のヒト G34 酵素タンパク質は、好ましくは、配列番号 2 に記載のアミノ酸番号 189 から C 末端までのアミノ酸配列、より好ましくは、後述の実施例で得られたようなアミノ酸番号 36 から C 末端までのアミノ酸配列を有するものであり得る。また本発明のマウス G34 酵素タンパク質は、好ましくは配列番号 4 に記載のアミノ酸番号 35 から C 末端までのアミノ酸配列を有するものであり得る。

また、一般に酵素のような生理活性を有するタンパク質においては、上記アミノ酸配列のうち、1 若しくは複数個のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ酸配列に 1 若しくは複数個のアミノ酸が挿入され若しくは付加された場合であっても、該生理活性が維持され得ることは周知である。また、天然産のタンパク質の中には、それを生産する生物種の品種の違いや、生態型 (ecotype) の違いによる遺伝子の変異、あるいはよく似たアイソザイムの存在等に起因して、1 個～複数個のアミノ酸変異を有する変異タンパク質が存在することも知ら

れている。この観点から、本発明のタンパク質には、配列番号 2 又は 4 に示される各アミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ酸配列に 1 若しくは複数個のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、上記所定の酵素反応条件下で GalNAc 残基を

5 GlcNAc 残基に  $\beta$  1-3 グリコシド結合で転移する活性を有する変異タンパク質も含まれる。さらに、前記修飾タンパク質としては、配列番号 2 又は 4 に示される各アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ酸配列に 1 若しくは数個のアミノ酸が挿入され若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものが特に好ましい。

10 上記において「複数個」とは、好ましくは 1 ~ 200 個、より好ましくは 1 ~ 100 個、さらにより好ましくは 1 ~ 50 個、最も好ましくは 1 ~ 20 個である。一般的には、部位特異的な変異によってアミノ酸が置換された場合に、元々のタンパク質が有する活性は保持される程度に置換が可能なアミノ酸の個数は、好ましくは 1 ~ 10 個である。

15 また、本発明の修飾タンパク質には、同様の性質を有するアミノ酸同士の置換で得られる修飾タンパク質が含まれる。すなわち、一般に同様の性質を有するアミノ酸同士の置換（例えば、ある疎水性アミノ酸から別の疎水性アミノ酸への置換、ある親水性アミノ酸から別の親水性アミノ酸への置換、ある酸性アミノ酸から別の酸性アミノ酸への置換、あるいはある塩基性アミノ酸から別の塩基性アミノ酸への置換）を導入して所望の変異を有する組換えタンパク質を作製する手法は当業者に周知であり、そのようにして得られた修飾タンパク質は元来のタンパク質と同様の性質を有することが多い。この観点から、そのようにアミノ酸置換された修飾タンパク質も本発明に含まれる。

20 また、本発明の修飾タンパク質は、上述した通りのアミノ酸配列を有し且つ目的酵素に生来的な酵素活性を有するものであれば、当該ポリペプチドに糖鎖が結合した糖タンパク質であつてもよい。

また、本発明の相同タンパク質の範囲を特定するに当たり、本発明の配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列について GENE T Y X（ゼネティックス社）による同一性検索を行うと、該アミノ酸配列は、最もホモロジーの高い公知の

$\beta$ 1,4GalNAc 転移酵素（上記非特許文献1）とは14%の同一性を有し、また最もホモロジーの高い公知の  $\beta$ 1,3Gal 転移酵素とは30%の同一性を有する（上記非特許文献2）。これらの観点から、本発明の相同タンパク質として好適なアミノ酸配列は、配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列と30%を超える同一性、より好ましくは少なくとも40%の同一性、特に好ましくは少なくとも50%の同一性を有することが好ましい。

また、配列番号2と配列番号4とに記載のアミノ酸配列同士では88%の同一性を有する。この観点から、本発明の相同タンパク質として好適なアミノ酸配列は、配列番号2中のアミノ酸配列に対し、少なくとも88%、より好ましくは90%の同一性を有すると定義することもできる。

なお、前記 GENETYX は、核酸解析、タンパク質解析用の遺伝情報処理ソフトウェアであって、通常ホモロジー解析やマルチアラインメント解析の他、シグナルペプチド予測やプロモーター部位予測、二次構造予測が可能である。また、本明細書で用いたホモロジー解析プログラムは、高速・高感度な方法として多用されている Lipman-Pearson 法 (Lipman, D. J. & Pearson, W. R., Science, 277, 1435-1441 (1985)) を採用している。本願明細書において、同一性のパーセントは、例えば、Altschul ら (Nucl. Acids. Res., 25, 3389-3402 (1997)) に記載されている BLAST プログラム、あるいは Pearson ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2444-2448 (1988)) に記載されている FASTA を用いて配列情報と比較し決定することが可能である。当該プログラムは、インターネット上で National Center for Biotechnology Information (NCBI)、あるいは DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のウェブサイトから利用することが可能である。各プログラムによる同一性検索の各種条件（パラメーター）は同サイトに詳しく記載されており、一部の設定を適宜変更することが可能であるが、検索は通常デフォルト値を用いて行う。なお、当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた使用可能である。

第3に、本発明の単離されたタンパク質は、後述のように、これを免疫原として動物に投与することによって該タンパク質に対する抗体を作製することができる。そのような抗体を用いて免疫測定法により当該酵素を測定、定量することが

できる。従って、本発明は、そのような免疫原の作製にも有用である。この観点からは、本発明のタンパク質には、抗体形成を引き出すための抗原決定基又はエピトープを含む、該タンパク質のポリペプチド断片、変異体、融合タンパク質なども含まれる。

#### 5 (4) 本発明の G34 酵素タンパク質の単離及び精製

本発明の酵素タンパク質は、以下の方法により単離・精製することができる。

近年、遺伝子工学的手法として、形質転換体を培養し生育させて、その培養物ないし生育物から目的物質を単離・精製する手法が確立されている。本発明の酵素タンパク質も、例えば、本発明の核酸を組み込んだ発現ベクターを含む形質転換体を栄養培地で培養することによって発現（産生）させることができる。

形質転換体の栄養培地としては、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖、メタノールなどが、例示される。無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また、所望により他の栄養素（例えば無機塩（例えば、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。培養は、当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地の pH 及び培養時間は、本発明に係るタンパク質が大量に生産されるように適宜選択される。

本発明の酵素タンパク質は、上記培養物ないし生育物から以下のようにして取得することができる。すなわち、目的タンパク質が宿主細胞内に蓄積する場合には、遠心分離やろ過などの操作により宿主細胞を集め、これを適当な緩衝液（例えば濃度が 10～100 mM 程度のトリス緩衝液、リン酸緩衝液、HEPES 緩衝液、MES 緩衝液などの緩衝液。pH は用いる緩衝液によって異なるが、pH 5.0～9.0 の範囲が望ましい）に懸濁した後、用いる宿主細胞に適した方法で細胞を破壊し、遠心分離により宿主細胞の内容物を得る。一方、目的タンパク

質が宿主細胞外に分泌される場合には、遠心分離やろ過などの操作により宿主細胞と培地を分離し、培養ろ液を得る。宿主細胞破壊液、あるいは培養ろ液はそのまま、または硫酸沈殿と透析を行なった後に、そのタンパク質の単離・精製に供することができる。

- 5 目的タンパク質の単離・精製の方法としては、以下の方法を挙げることができる。すなわち、当該タンパクに6×ヒスチジンやGST、マルトース結合タンパクといったタグを付けている場合には、一般に用いられるそれぞれのタグに適したアフィニティークロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。一方、そのようなタグを付けずに本発明に係るタンパク質を生産した場合には、例えば
- 10 イオン交換クロマトグラフィーによる方法を挙げることができる。また、これに加えて、ゲルろ過や疎水性クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィーなどを組み合わせる方法でもよい。

- また単離・精製が容易となるような発現ベクターを構築するとよい。特に、酵素活性を有するポリペプチドと標識ペプチドとの融合タンパク質の形態で発現する
- 15 ように発現ベクターを構築し、遺伝子工学的に当該酵素タンパク質を調製すれば、単離・精製も容易である。上記識別ペプチドの例としては、本発明に係る酵素を遺伝子組み換えによって調製する際に、該識別ペプチドと酵素活性を有するポリペプチドとが結合した融合タンパク質として発現させることにより、形質転換体の生育物から本発明に係る酵素の分泌・分離・精製又は検出を容易にすること
- 20 を可能とする機能を有したペプチドである。

- そのような識別ペプチドとしては、例えばシグナルペプチド（多くのタンパク質のN末端に存在し、細胞内の膜透過機構においてタンパク質の選別のために細胞内では機能している15～30アミノ酸残基からなるペプチド：例えばOmpA、OmpT、Dsb等）、プロテインキナーゼA、プロテインA（黄色ブドウ球菌細胞壁
- 25 の構成成分で分子量約42,000のタンパク質）、グルタチオンS転移酵素、Hisタグ（ヒスチジン残基を6乃至10個並べて配した配列）、mycタグ（cMycタンパク質由来の13アミノ酸配列）、FLAGペプチド（8アミノ酸残基からなる分析用マーカー）、T7タグ（gene10タンパク質の最初の11アミノ酸残基からなる）、Sタグ（膵臓RNaseA由来の15アミノ酸残基からなる）、HSVタグ、pelB

(大腸菌外膜タンパク質 pelB の 22 アミノ酸配列)、HA タグ (ヘマグルチニン由来の 10 アミノ酸残基からなる)、Trx タグ (チオレドキシン配列)、CBP タグ (カルモジュリン結合ペプチド)、CBD タグ (セルロース結合ドメイン)、CBR タグ (コラーゲン結合ドメイン)、 $\beta$ -lac/blu ( $\beta$  ラクターマーゼ)、 $\beta$ -gal ( $\beta$  ガラクトシダーゼ)、luc (ルシフェラーゼ)、HP-Thio (His-patch チオレドキシン)、HSP (熱ショックペプチド)、Ln $\gamma$  (ラミニン  $\gamma$  ペプチド)、Fn (フィブロネクチン部分ペプチド)、GFP (緑色蛍光ペプチド)、YFP (黄色蛍光ペプチド)、CFP (シアン蛍光ペプチド)、BFP (青色蛍光ペプチド)、DsRed、DsRed2 (赤色蛍光ペプチド)、MBP (マルトース結合ペプチド)、LacZ (ラクトースオペレーター)、IgG (免疫グロブリン G)、アビジン、プロテイン G 等のペプチドが挙げられ、何れの識別ペプチドであっても使用することが可能である。

それらの中でも特にシグナルペプチド、プロテインキナーゼ A、プロテイン A、グルタチオン S 転移酵素、His タグ、myc タグ、FLAG ペプチド、T7 タグ、S タグ、HSV タグ、pelB 又は HA タグが、遺伝子工学的手法による本発明に係る酵素の発現、精製がより容易となることから好ましく、特に FLAG ペプチド (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) との融合タンパク質として得るのが、取扱面で極めて優れているため好ましい。上記 FLAG ペプチドは非常に抗原性であり、そして特異的なモノクローナル抗体が可逆的に結合するエピトープを提供し、発現された組換えタンパク質の迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。4E11 と称されるネズミハイブリドーマは、米国特許第 5,011,912 (これを参照することにより本願明細書の開示に組み込む) に記載されるように、特定の二価金属陽イオンの存在下で、FLAG ペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する。4E11 ハイブリドーマ細胞株は、寄託番号 HB 9259 下に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) に寄託されている。FLAG ペプチドに結合するモノクローナル抗体は、Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division、コネチカット州ニューヘブーンより入手可能である。

哺乳類細胞で発現可能であって、かつ上述の FLAG ペプチドとの融合タンパク



質として本発明の酵素タンパク質を得ることができる基本ベクターとしては、例えば pFLAG-CMV-1 (シグマ社) がある。また、昆虫細胞で発現可能なベクターとしては、pFBIF (pFastBac (インビトロジェン社) に FLAG ペプチドをコードする領域を組み込んだベクター：後述の実施例参照) 等が例示されるが、これらに  
5 限定されない。当業者であれば、当該酵素の発現に使用する宿主細胞、制限酵素、識別ペプチドなどから判断して適当な基本ベクターを選択することが可能である。

#### (5) 本発明の G34 酵素タンパク質を認識する抗体

本発明により、G34 酵素タンパク質に免疫反応性である抗体が提供される。こ  
10 うした抗体は、(非特異的結合と対照的に) 抗体の抗原結合部位を介して、該酵素タンパク質に特異的に結合し得る。具体的には、配列番号 2 又は 4 のアミノ酸配列を有するタンパク質、又はその断片、変異体若しくは融合タンパク質などを、それぞれに免疫反応性である抗体を産生するための免疫原として使用することが可能である。

より具体的には、タンパク質、断片、変異体、融合タンパク質などは、抗体形成を引き出す抗原決定基またはエпитープを含むが、これら抗原決定基またはエ  
15 ピトープは、直鎖でもよいし、より高次構造(断続的)でもよい。なお、該抗原決定基またはエピトープは、当該技術分野に知られるあらゆる方法によって同定できる。したがって、本発明は、G34 酵素タンパク質の抗原性エピトープにも関  
20 する。こうしたエピトープは、以下により詳細に記載されるように、抗体、特にモノクローナル抗体を作成するのに有用である。

本発明のエピトープは、アッセイにおいて、そしてポリクローナル血清または培養ハイブリドーマ由来の上清などの物質から特異的に結合する抗体を精製する  
25 ための研究試薬として使用可能である。こうしたエピトープまたはその変異体は、固相合成、タンパク質の化学的または酵素的切断などの当該技術分野において公知の技術を用いて、あるいは組換え DNA 技術を用いて産生することができる。

本発明の酵素タンパク質によってあらゆる態様の抗体が誘導される。該タンパク質のポリペプチド全部若しくは一部又はエピトープが単離されていれば、慣用

的技術を用いてポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれも調製可能である。例えば、Kennet ら（監修），Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York, 1980 を参照されたい。

- 5 本発明によれば、G34 酵素タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株も提供される。こうしたハイブリドーマは、慣用的技術によって産生し、そして同定することが可能である。こうしたハイブリドーマ細胞株を産生するための1つの方法は、動物を本発明の酵素タンパク質で免疫し、免疫された動物から脾臓細胞を採取し、該脾臓細胞を骨髓腫細胞株に融合させ、  
10 それによりハイブリドーマ細胞を生成し、そして該酵素に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定することを含む。モノクローナル抗体は、慣用的技術によって回収可能である。

- 本発明のモノクローナル抗体には、キメラ抗体、例えば、ネズミモノクローナル抗体のヒト化型が含まれる。こうしたヒト化型抗体は、ヒトに投与されて免疫  
15 原性を減少させるという利点を有する。

また本発明によれば、上記抗体の抗原結合断片も提供される。慣用的技術によって産生可能な抗原結合断片の例には、F a b および F ( a b ' )<sub>2</sub>断片が含まれるが、これらに限定されない。遺伝子工学技術によって産生可能な抗体断片および誘導体もまた提供される。

- 20 本発明の抗体は、in vitro 及び in vivo のいずれにおいても、本発明の G34 酵素タンパク質又はそのポリペプチド断片の存在を検出するためのアッセイに使用可能である。また本発明の抗体は、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって G34 酵素タンパク質又はそのポリペプチド断片を精製することにも使用することができる。

- 25 さらに本発明の抗体は、結合パートナー、例えば受容体基質への前記糖転移酵素タンパク質の結合を遮断することが可能な遮断抗体として提供されてもよく、そのような結合により当該酵素の生物活性を阻害可能である。こうした遮断抗体は、受容体基質を発現している特定の細胞への該タンパク質の結合を阻害する能力に関して抗体を試験するなど、あらゆる適切なアッセイ法を用いて同定するこ

とができる。

また遮断抗体は、標的細胞の結合パートナーに結合している該酵素タンパク質から生じる生物学的影響を阻害する能力に関するアッセイにおいても同定可能である。こうした抗体は、*in vitro* 法で使用するか又は *in vivo* で投与して、抗体を生成した実体によって仲介される生物活性を阻害し得る。従って、本発明によれば、G34 酵素タンパク質と結合パートナーとの間の直接又は間接的な相互作用に起因して引き起こされるか又は悪化する障害を治療するための抗体も提供され得る。こうした療法は、結合パートナー仲介生物学的活性を阻害するのに有効な量の遮断抗体を哺乳動物に *in vivo* 投与することを含むであろう。一般にこうした療法の使用にはモノクローナル抗体が好ましく、1つの態様として抗原結合抗体断片が使用される。

#### (6) 癌化検定のための本発明の核酸

本発明者は、上述した G34 酵素タンパク質の発見に伴い、このタンパク質をコードする mRNA が癌化組織及び細胞株において広く認められ、特にその発現量が癌化組織において有意に上昇していることを確認した。したがって、G34 核酸は、転写産物を含む生物試料を対象とした癌診断等に有用な癌マーカーとして有用である。この側面において、本発明は、配列番号 1 又は 3 に記載の塩基配列により定義される核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る測定用核酸を提供する。

本発明の測定用核酸の一態様は、生物試料中の G34 核酸を標的とするもので、配列番号 1 又は 3 の塩基配列から選ばれる塩基配列を有するプライマー又はプローブである。特に配列番号 1 の塩基配列は構造遺伝子をコードする mRNA 由来のもので、当該 G34 遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF) 全域を含むことから、通常、生物試料に由来する転写産物中には、配列番号 1 又は 3 の全長ないしそれに近い大部分長が見出される。この観点から、本発明によるプライマー又はプローブは、配列番号 1 又は 3 の各塩基配列から選択される所望の部分配列 (当該選択配列と相同であるか相補的であるべきかは使用方法に依存して決定される) 有し、このようにして当該標的配列に特異的にハイブリダイズできる核酸として提供できる。

典型的なプライマー又はプローブには、配列番号 1 又は 3 の少なくとも一部の塩基配列を有する核酸に由来する天然の DNA フラグメント、配列番号 1 又は 3 の少なくとも一部の塩基配列を有するように合成された DNA フラグメント、又はそれらの相補鎖が挙げられる。

- 5      上記のようなプライマー又はプローブを用いて、後述のように生物試料中の該標的核酸を検出及び／又は定量することができる。また、ゲノム上の配列も標的となり得るので、本発明の核酸は、医学研究用又は遺伝子治療用のアンチセンスプライマーとして使用してもよい。

(A) 本発明のプローブ

- 10      本発明の測定用核酸の好ましい態様は、配列番号 1 又は 3 の塩基配列を有する核酸又は少なくともその何れか一方の相補鎖を標的としたプローブであって、これら塩基配列から選ばれる少なくとも十数個、好ましくは 15 塩基以上、好ましくは 17 塩基以上、より好ましくは 20 塩基以上のオリゴヌクレオチド若しくはそれらの相補鎖、或いは、その ORF 領域全長の cDNA 若しくはその相補鎖が含ま  
15      れる。

- オリゴヌクレオチドプローブとする場合、本発明の測定用核酸は、十数塩基、例えば 15 塩基、好ましくは 17 塩基ほどの長さもあれば、ストリンジेंटな条件下でその標的核酸に対し特異的にハイブリダイズし得ると理解される。すなわち、当業者であれば、オリゴヌクレオチドプローブ設計に関する公知の各種  
20      ストラテジーに従い、配列番号 1 又は 3 の塩基配列から少なくとも 15 塩基～20 塩基の適切な部分配列を選択することができる。この場合に配列番号 2 又は 4 のアミノ酸配列情報は、プローブとして適切と思われるユニークな配列を選定するのに役立つ。

- また、cDNA プローブとする場合、例えば、一般に医学研究用の試薬又は診断  
25      薬としてのプローブは、大きい分子量のものは取り扱い難いので、この見地から、医学研究を目的とした本発明のプローブとしては、配列番号 1 又は 3 の各塩基配列から選ばれる 50～500 塩基、より好ましくは 60～300 塩基からなる核酸が例示される。

上記ストリンジेंटな条件下とは、既に説明したような中程度又は高程度な

ストリンジェント条件を意味する。当業者であれば、公知の各種プローブ設計法及びハイブリダイゼーション条件に関する技術常識並びに経験則を基に、選択したプローブにとって適切な中程度又は高程度にストリンジェントな条件を容易に見つけ出し、実施することができる。

- 5      また、選択される塩基長及び適用されるハイブリダイズ条件等に依存するが、比較的短鎖のオリゴヌクレオチドプローブは、配列番号1又は3の塩基配列と比較して1又は数個の塩基、特に1又は2塩基程度の不一致があってもプローブとしての機能を果たし得る。また、比較的長鎖のcDNAプローブは、配列番号1の塩基配列又はその相補的な塩基配列と50%以下、好ましくは20%以下の不一致があっても、プローブとしての機能を果たし得る。
- 10

上記のようにして設計される本発明のプローブは、G34中の標的配列とのハイブリッドを検出または確認するために、蛍光標識、放射標識、ビオチン標識等の標識を付した標識プローブとして使用されることができる。

- 例えば、本発明の標識プローブは、G34核酸からのPCR増幅産物を確認又は定
- 15      量するために使用することができる。この場合、PCRに使用される一対のプライマー配列の間に位置する領域の当該塩基配列を標的としたプローブを使用するとよい。そのようなプローブの一例は、配列番号16に記載の塩基配列（配列番号1中の塩基番号525-556の相補鎖に相当する）からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる（実施例3参照）。

- 20      また、本発明のプローブは、診断用DNAプローブキット等に組み込まれてもよいし、DNAマイクロアレイ等のチップ上に固定されてもよい。

#### （B）本発明のプライマー

- 本発明の癌化検定用核酸から得られるプライマーの好ましい態様は、オリゴヌクレオチドプライマーである。オリゴヌクレオチドプライマーの製造に当たって
- 25      は、配列番号1又は3の塩基配列のORF領域から以下の条件を満たすように2つの領域を選択するとよい。

- a) 各領域の長さが数十塩基以上、特に15塩基以上、好ましくは17塩基以上、より好ましくは20塩基以上であり、且つ50塩基以下であること；さらに
- b) 各領域中のG+Cの割合が40～70%であること；

実際には、上記のように選択した2つの領域と同じ塩基配列若しくはそれらに相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAとして製造してもよいし、それら塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した一本鎖DNAを製造してもよい。本発明のプライマーは、選択された標的配列と完全に相補的な配列を有することが好ましいが、1または2塩基の不一致があっても差し支えない。

本発明による一対のプライマーの例としては、ヒトG34では配列番号14と配列番号15（それぞれ、配列番号1中の塩基番号481-501の配列及び塩基番号562-581の相補鎖に相当する）からなる一組のオリゴヌクレオチドが挙げられ、また、マウスG34では配列番号17と配列番号18（それぞれ、配列番号3中の塩基番号481-501の配列及び塩基番号562-581の相補鎖に相当する）からなる一組のオリゴヌクレオチドが挙げられる。

#### （7）本発明による癌化検定方法

既に述べた通り、本発明のG34核酸は、癌化した生物試料中の発現量（すなわち当該遺伝子のゲノムからmRNAへの転写レベル）が、その健常生物試料よりも有意に上昇していることが確認された。少なくとも大腸癌又は肺癌の癌化検定に有用であることが明らかにされた（実施例3参照）。

本発明の癌化検定方法の具体的態様によれば、生物試料から抽出された転写産物又はそれに由来する核酸ライブラリーを被検試料として、上述のプローブ又はプライマーを用いて当該G34核酸の量（典型的にはmRNA量）を測定し、そして、この測定値が健常生物試料のそれを有意に上回るか否かを判断する。ここで、被検生物試料の測定値が健常生物試料の基準値を有意に上回る場合に、その被検生物試料は癌化している或いは悪性度が高いと判断される。

本発明の癌化検定法において、対照となる健常生物試料についての基準値は、同一患者の同一組織における対照部位（典型的には正常な部位）についての測定値を利用してもよいし、対照部位から得られた既知のデータ等を基に一般化された値、例えば健常組織におけるmRNA量の平均値を利用してもよい。

なお、本発明の測定用核酸を使用した発現量の測定によると、ヒトG34は正常部位では脳、骨格筋、脾臓、副腎、精巣、及び前立腺において高いレベルの発現が認められ、他の部位でも比較的低いレベルであるが有意な発現が認められる

。このようにヒト G34 の発現は各種組織全般に広く認められ、そして、大腸及び肺の組織のような比較的発現レベルの低い組織でも、ヒト G34 の発現量は有意に上昇することが判明した。これらのデータが提供されることによって、当業者は、本発明の測定用核酸の具体的な有用性と効果を認識するであろう。

- 5      本検定法において、被検試料についての測定値が健常試料と比較して有意に上回るかは、当該検定に必要とされる精度（陽性率）や判定すべき悪性度に従って設定される基準で判断されることができる。例えば、悪性度の高い組織の検出を目的として、陽性とすべき基準値をより低く設定したり、或いは癌化の兆候ないし可能性のある被検試料を網羅的に検出することを目的として、陽性とすべき基準値をより高く設定するなど、目的に応じて任意に判定基準を設けることができる。

以下では、ハイブリダイゼーション法と PCR 法を例に挙げ、本発明の癌化検定法を説明する。

#### (A) ハイブリダイゼーション検定法

- 15      本検定法の態様には、例えば、本発明の核酸から得られるプローブを使用したサザンブロット、ノーザンブロット、ドットブロット、又はコロニーハイブリダイゼーション法等のような当業者に周知である各種ハイブリダイゼーション検定を用いた方法が含まれる。さらに検出シグナルの増幅や定量が必要とされる場合、それらを免疫学的検定法と組み合わせてもよい。

- 20      典型的なハイブリダイゼーション検定法によれば、生物試料から抽出された核酸またはその増幅物が固相化され、標識プローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせ、洗浄後、固相に結合された標識が測定される。

生物試料からの転写産物の抽出及び精製は、当業者に知られているあらゆる方法を使用して行うことができる。

- 25      (B) PCR 検定法

本発明の癌化検定法の好ましい態様には、本発明のプライマーでの核酸増幅反応を利用した PCR 法も含まれる。PCR の詳細は、既に説明した通りである。ここでは PCR を利用した本検定法の具体的態様を説明する。

検定すべき転写産物中の G34 の mRNA は、その塩基配列から選ばれる所定領域

の両端に位置する一対のプライマーを使用した PCR により増幅することができる。この工程において、検体中に G34 核酸が僅かでも存在すると、それらが鋳型となりプライマー対間の核酸領域が次々と複製され増幅される。PCR での所定サイクル数の繰り返しによって、鋳型とされた核酸は、所望の濃度まで増幅される。同じ増幅反応条件であれば、検体中に存在した G34 の mRNA 量に比例した増幅産物が得られる。そして、当該増幅領域を標的とする上記プローブ等を使用して増幅産物が目的の核酸であるか確認し、それを定量することができる。また、健全組織中の当該核酸も同様にして測定される得る。なお、同一組織等に広く一般的に存在する遺伝子の核酸、例えばグリセルアルデヒド-3 リン酸-脱水素酵素 (GAPDH)、 $\beta$ -アクチンをコードする核酸を対照として利用し、個体差を除去するとよい。前記 G34 の転写レベルについての測定値は、上述したように癌化の有無ないし悪性度を検定するために対比される。

PCR 法に供される核酸試料は、被検組織又は細胞などの生物試料から抽出された mRNA 総体でも、mRNA から逆転写した cDNA 総体でもよい。mRNA を増幅する場合には、既述のプライマー対を用いた NASBA 法 (3SR 法、TMA 法) を採用してもよい。NASBA 法自体は周知であり、且つそのためのキットも市販されているので、本発明のプライマー対を用いて容易に実施することができる。

上記増幅産物の検出又は定量は、増幅後の反応溶液を電気泳動し、バンドをエチジウムブロミド等で染色する方法や、電気泳動後の増幅産物をナイロン膜等の固相に不動化し、被検核酸と特異的にハイブリダイズする標識プローブ (例えば、配列番号 16 の塩基配列を有する) をハイブリダイズさせ、洗浄後、該標識を検出することにより行うことができる。

また、本検定法に好適な PCR 法としては、定量的 PCR 法、特にキネティックス分析のための RT-PCR 法、定量的リアルタイム PCR 法が挙げられる。特に mRNA ライブラリーを対象とする定量的リアルタイム RT-PCR 法は、測定対象が生物試料から直接に精製でき且つ転写レベルを直接反映しているという観点から好適である。但し、本検定法における核酸の定量は、定量的 PCR 法に限定されるものではなく、PCR 産物に対して、上述のプローブを用いたノーザンブロット、ドットブロット、DNA マイクロアレイのような公知の他の DNA 定量法を適用



し得る。

また、クエンチャー蛍光色素とレポーター蛍光色素を用いた定量的 RT-PCR を行うことにより、検体中の標的核酸の量を定量することも可能である。特に定量的 RT-PCR 用のキットが市販されているので、容易に行うことができる。さらに、電気泳動バンドの強度に基づいて標的核酸を半定量することも可能である。

#### (C) 癌治療効果に関する検定法

本発明の癌化検定法の他の態様として、癌の治癒ないし緩和の効果を判断するための検定も挙げられる。例えば、検定の対象には、抗癌剤の投与、放射線治療等のあらゆる処置が含まれ、それら処置の対象には、癌患者又は発癌実験モデル動物由来の *in vitro* 癌細胞や癌組織が含まれる。

この検定法によれば、生物試料に或る処置が施された場合、当該生物試料中の G34 核酸の転写レベルが当該処置に起因して低下するか否かを判断することにより、当該処置の癌への治療効果を知ることができる。また、転写レベルが低下するか否かの判断に限らず、上昇が有意に抑制される場合に有効であると評価してもよい。転写レベルの比較は、未処置組織との比較だけでなく、処置後おける経時的追跡でもよい。

本発明による癌治療効果検定には、例えば、癌化組織に抗癌剤候補物質が効くか否か、癌患者に投与中の抗癌剤に対して耐性が形成されているか否か、実験モデル動物の病変組織等に効くか否か等の判断が含まれる。実験モデル動物の被検組織は、*in vitro* に限らず *in vivo* 又は *ex vivo* 試料も含まれる。

#### (8) 遺伝子操作動物の作製

既に述べたように、本発明者によりマウス G34 の存在とその核酸配列（配列番号 3）が突き止められた。本発明は、受精卵や ES 細胞を用いた各種遺伝子変換技術に基づく動物個体レベルでの G34 の発現・機能解析の手段、典型的には G34 遺伝子を導入したトランスジェニック動物、及びマウス G34 を欠損させたノックアウトマウスの作製等にも関する。

例えば、ノックアウトマウスの作製は、当該技術分野における常法に従って行うことができる（ジーンターゲティングの最新技術 八木健編集 羊土社：ジーンターゲティング 野田哲生監訳 メディカル・サイエンス・インターナショナル）

ル社等を参照すればよい)。すなわち、当業者であれば、本願において開示されたマウス G34 核酸配列情報を利用し、公知のジーンターゲット法に従って G34 の相同組換え ES 細胞を取得することができ、これを用いて G34 ノックアウトマウスを作製することができる(実施例7 参照)。

- 5      また、最近では small interfering RNA 法により遺伝子発現を抑制する方法が開発されており (T.R. Brummelkamp et al., Science, 296, 550-553 (2002))、このような公知の方法に従い G34 ノックアウトマウスを作製することもできる。

- 10      G34 ノックアウトマウスを提供することは、特定の生命現象への G34 遺伝子の関与、すなわち、当該遺伝子の重複性に関する情報のほか、当該遺伝子欠損と個体レベルでの表現型(運動、知能、感覚機能に関するあらゆるタイプの異常が含まれる)との関係、さらには発生、成長、老化といった個体のライフサイクルにおける当該遺伝子の機能の解明に役立つであろう。より詳細には、上記の方法により得られるノックアウトマウスを用いて G34 および mG34 が合成する糖鎖のキャリアの検出および生理的機能、疾患との関連等について検討することができる。
- 15      例えば、ノックアウトマウスより摘出した各組織より糖蛋白質および糖脂質を抽出し、プロテオミックス等の技法(例えば二次元電気泳動、二次元薄層クロマトグラフィ、質量分析等)により野生型マウスと比較することで、合成された糖鎖のキャリアを同定できる。また、ノックアウトマウスと野生型マウスの表現系
- 20      (例えば、胎児形成、発育過程、自発行動等)を比較することにより生理的機能や疾患との関連を推定することができる。

#### 用語の定義

- 25      本明細書において、核酸についての転写レベルの「測定値」又は「発現量」というときは、一定量の生物試料由来の転写産物中に存在する当該核酸の量、すなわち当該核酸濃度を示す。また本発明の検定法は、それらの測定値を比較することに依拠するのであるから、核酸が定量のために PCR 等によって増幅されたり、プローブ標識からのシグナルが増幅された場合にも、それら増幅された値について相対的な対比が可能である。したがって、「核酸についての測定値」とは増幅後の量又は増幅後のシグナルレベルとして把握されることもできる。

本明細書において「標的核酸」又は「当該核酸」というときは、in vivo 又は in vitro のいずれかを問わず、G34 の mRNA はもちろんのこと、その mRNA を鋳型にして得られるあらゆるタイプの核酸が含まれる。なお本明細書において「塩基配列」というときは、特に断らない限り、それに相補的な配列も包含される。

- 5 本明細書において、「生物試料」というときは、器官、組織及び細胞、並びに実験動物由来の器官、組織及び細胞等を示すが、好ましくは組織又は細胞である。例えば、組織には、脳、胎児脳、小脳、延髄、顎下腺、甲状腺、気管、肺、心臓、骨格筋、食道、十二指腸、小腸、大腸、直腸、結腸、肝臓、胎児肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胸腺、骨髄、脾臓、精巣、前立腺、乳腺、子宮、胎盤が、より好ましくは大腸及び肺である。

- 10 本明細書において「測定」又は「検定」という用語には、検出、増幅、定量、および半定量のいずれもが包含される。特に本発明による検定法は、上記の通り、生物試料の癌化の検定に関するものであり、医療分野における癌の診断や治療等に応用することができる。ここで「癌化の検定」という用語には、生物試料が
- 15 発癌しているか否かについての検定のほか、悪性度が高いか否かについての検定も含まれる。本明細書において「癌」という用語には、典型的には悪性腫瘍全般を含み、該悪性腫瘍による疾病状態を含む。従って、本発明による検定法の対象は、特に限定されるわけではないが、神経芽腫、神経膠腫、肺癌、食道癌、胃癌、脾臓癌、肝臓癌、腎臓癌、十二指腸癌、小腸癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、白血
- 20 病、好ましくは大腸癌、肺癌である。

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明する。

#### [実施例]

##### 実施例 1：ヒト G34 遺伝子のクローニングと発現、並びに発現タンパク質の精製

- 25  $\beta$  3 ガラクトース転移酵素 6 ( $\beta$  3GalT6) をクエリーとして BLAST 検索を行った結果、ホモロジーを有する核酸配列 (配列番号 1) が見出された。該核酸配列から予測されるオープンリーディングフレーム (ORF) は 1503 bp、アミノ酸配列にして 500 アミノ酸 (配列番号 2) からなる。これら核酸配列及びアミノ酸配列がコードする生成物をヒト G34 と命名した。

G34 のアミノ酸配列 N 末端には、糖転移酵素の特徴である疎水アミノ酸領域があり、前記  $\beta$ 3GalT6 との相同性は核酸配列で 47%、アミノ酸配列で 28% である。また、 $\beta$ 3GalT ファミリーに保持されている 3 つのモチーフ全てを保持している。

- 5 本実施例では、哺乳動物細胞での G34 の発現を確認したほか、その活性の詳細を調べるために G34 を昆虫細胞内で発現させた。

活性を確認するには配列番号 1 の少なくとも  $\beta$ 3GalT6 と比較的同源性が保たれている 189 番アミノ酸から C 末端までの活性領域を発現させれば十分であると考えられるが、本実施例では 36 番アミノ酸から C 末端までの活性領域  
10 を発現させることとした。

#### ヒト G34 遺伝子の哺乳動物細胞での発現の確認

G34 の 36 番アミノ酸から C 末端までの活性領域を FLAG Protein Expression System (シグマアルドリッチ社) により哺乳動物由来細胞株発現ベクター pFLAG-CMV3 に遺伝子導入した。pFLAG-CMV3 を使用すれば、マルチクローニング  
15 サイトを有しており、目的遺伝子及び pFLAG-CMV3 を制限酵素処理した後、ライゲーション反応を行うことで目的遺伝子を pFLAG-CMV3 に導入できる。

腎から得られた cDNA (クロンテック社製、Marathon-ready cDNA) を鋳型とし 5' プライマー (G34-CMV-F1 : 配列番号 5) と 3' プライマー (G34-CMV-R1 : 配列番号 6) を用いて PCR 反応を行い、目的の DNA 断片を得た。PCR 法は 98℃  
20 10 秒、55℃ 30 秒、72℃ 2 分を 25 回繰り返す条件で行った。そして PCR 産物をアガロースゲル電気泳動を行い、ゲル切り出し法でゲルを切り出して定法により単離した。この PCR 産物は制限酵素サイトとして 5' 側に HindIII、3' 側に BamHI を有する。

この DNA 断片と pFLAG-CMV3 を各々制限酵素である HindIII 及び BamHI にて処  
25 理した後、反応液を混合し、ライゲーション反応を行うことで pFLAG-CMV3 に導入した。反応液をエタノール沈殿法により精製した後、コンピテントセル (大腸菌 DH5 $\alpha$ ) と混合し、ヒートショック法 (42℃、30 秒) を行い、アンピシリンを含む LB 寒天培地に播いた。

翌日得られたコロニーを、直接 PCR で目的 DNA を確認した。さらに確実を期

すためシーケンシングにより DNA 配列の確認をした後、ベクター (pFLAG-CMV3-G34A) を抽出・精製した。

ヒト腎臓細胞由来細胞株 293T 細胞  $2 \times 10^6$  個を抗生物質を含まない 10% ウシ胎児血清入りの DMEM 培地 (インビトロジェン社) 10 ml にて懸濁し、10 cm ディッシュに播き、16 時間 37°C にて CO<sub>2</sub> インキュベータにて培養した。pFLAG-CMV3-G34A の 20 ng 及び Lipofectamin 2000 (インビトロジェン社) 30  $\mu$ l を OPTI-MEM (インビトロジェン社) 1.5 ml と各々混和し、室温にて 5 分間インキュベーションした。更に二つの液を緩やかに混和し、室温にて 20 分間インキュベーションした。この混合液をディッシュに滴下し、48 時間 37°C にて CO<sub>2</sub> インキュベータにて培養した。

上清 10ml に NaN<sub>3</sub> (0.05 %)、NaCl (150 mM)、CaCl<sub>2</sub> (2 mM)、抗 FLAG-M1 レジン (Sigma 社) (100  $\mu$ l) を混合し、4°C で一夜攪拌した。翌日遠心して (3000 rpm 5 分、4°C) ペレットを回収し、2 mM の CaCl<sub>2</sub>・TBS を 900  $\mu$ l 加えて再度遠心分離 (2000 rpm 5 分、4°C) し、ペレットを 200  $\mu$ l の 1 mM CaCl<sub>2</sub>・TBS に浮遊させ活性測定のサンプル (G34 酵素液) とした。この一部を SDS-PAGE による電気泳動について抗 FLAG M2-ペルオキシダーゼ (SIGMA 社製) を用いてウエスタンブロッティングを行い、目的とする G34 タンパク質の発現を確認した。

その結果、約 60kDa の位置にバンドが検出、発現が確認された。

#### ヒト G34 遺伝子の昆虫細胞発現ベクターへの挿入

G34 の 36 番アミノ酸から C 末端までの活性領域を GATEWAY システム (インビトロジェン社) の pFastBac (インビトロジェン社製) に組み込み、さらに Bacto-Bac システム (インビトロジェン社) によるバクミドを作成した。

##### (1) エントリークロンの作成

Kidney から得られた cDNA (クロンテック社製、Marathon-ready cDNA) を鋳型とし 5' プライマー (G34-GW-F1 : 配列番号 7) と 3' プライマー (G34-GW-R1 : 配列番号 8) を用いて PCR 反応を行い、目的の DNA 断片を得た。PCR 法は 98°C 10 秒、55°C 30 秒、72°C 2 分を 25 回繰り返す条件で行った。そして PCR 産物をアガロースゲル電気泳動を行い、ゲル切り出し法でゲルを切り出して定法

により単離した。

この産物を BP クロナーゼ反応によって pDONR201 (インビトロジェン社製) へ組込み、「エントリークローン」を作成した。反応は目的とする DNA 断片 5  $\mu$ l、pDONR201 1  $\mu$ l (150ng)、反応緩衝液 2  $\mu$ l、BP クロナーゼ mix 2  $\mu$ l を 25°C で 1 時間インキュベートして行った。プロテイナーゼ K を 1  $\mu$ l 加えて 37°C 10 分おき反応を終了させた。その後上記反応液 1  $\mu$ l をコンピテントセル (大腸菌 DH5  $\alpha$ 、TOYOBO 社製) 100  $\mu$ l と混合し、ヒートショック法の後、カナマイシンを含む LB プレートにまいた。

翌日コロニーをとり、直接 PCR で目的 DNA を確認した。さらに確実を期すためシーケンシングにより DNA 配列の確認をした後、ベクター (pDONR-G34A) を抽出・精製した。

## (2) 発現クローンの作成

上記エントリークローンは挿入部位の両側にラムダファージが大腸菌から切り出される際の組換部位である attL を持つもので、LR クロナーゼ (ラムダファージの組換酵素 Int、IHF、Xis を混合したもの) とデステイネーションベクターと混合することで、挿入部位がデステイネーションベクターに移り、発現クローンが作成される。具体的工程は以下のとおりである。

まずエントリークローン 1  $\mu$ l、pFBIF を 0.5  $\mu$ l (75ng)、LR 反応緩衝液 2  $\mu$ l、TE4.5  $\mu$ l、LR クロナーゼ mix 2  $\mu$ l を 25°C で 1 時間反応させ、プロテイナーゼ K を 1  $\mu$ l 加えて 37°C 10 分インキュベートして反応を終了させた (この組換え反応で pFBIF-G34A が生成される)。pFBIF は、pFastBac1 に Ig $\kappa$  シグナル配列 (配列番号 9) と精製用の FLAG ペプチド (配列番号 10) を入れたもので、Ig $\kappa$  シグナル配列は発現タンパク質を分泌型にするため、FLAG ペプチドは精製のため挿入したものである。FLAG ペプチドは OT3 (配列番号 11) を鋳型とし、プライマー OT20 (配列番号 12) と、OT21 (配列番号 13) によって得られた DNA 断片を Bam HI と Eco RI で挿入した。さらに、Gateway 配列を挿入するため、Gateway Vector Conversion System (インビトロジェン社) を用いて Conversion cassette を入れた。

その後、上記混合液全量 (11  $\mu$ l) をコンピテントセル (大腸菌 DH5  $\alpha$ )

100  $\mu$ l と混合し、ヒートショック法の後、アンピシリンを含む LB プレートにまいた。翌日コロニーをとり、直接 PCR で目的 DNA を確認し、ベクター (p FBIF-G34A) を抽出・精製した。

### (3) Bac-to-Bac システムによるバクミドの作成

- 5 続いて Bac-to-Bac システム (インビトロジェン社) を用いて上記 p FBIF-と pFastBac との間で組換えを行わせ、昆虫細胞中で増殖可能なバクミド (Bacmid) に G34 その他の配列を挿入した。

このシステムは、Tn7 の組換え部位を利用して、バクミドを含む大腸菌 (DH10BAC、インビトロジェン社製) に目的遺伝子を挿入させた pFastBac を導入するだけで、ヘルパープラスミドから産生される組換えタンパク質によって目的とする遺伝子がバクミドへ取り込まれるというものである。またバクミドには lacZ 遺伝子が含まれており、古典的な青 (挿入なし) - 白コロニー (挿入あり) による選択が可能である。

- 15 即ち、上記精製ベクター (p FBIF-G34A) をコンピテントセル (大腸菌 DH10BAC) 50  $\mu$ l と混合し、ヒートショック法の後、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、Blueo-gal、及び IPTG を含む LB プレートに播き、翌日白い単独コロニーをさらに培養し、バクミドを回収した。

### ヒト G34 遺伝子を含むバクミドの昆虫細胞への導入

- 20 上記白コロニーから得られたバクミドに目的配列が挿入していることを確認した後、このバクミドを昆虫細胞 Sf21 (インビトロジェン社より市販) に導入した。

- 25 即ち 35mm のシャーレに Sf21 細胞  $9 \times 10^5$  細胞/2 ml (抗生物質を含む Sf-900SFM (インビトロジェン社製) を加え、27°C で 1 時間培養して細胞を接着した。(溶液 A) 精製した バクミド DNA 5  $\mu$ l に抗生物質を含まない Sf-900SFM 100  $\mu$ l 加えた。(溶液 B) CellFECTIN Reagent (インビトロジェン社製) 6  $\mu$ l に抗生物質を含まない Sf-900SFM 100  $\mu$ l 加えた。その後、溶液 A および溶液 B を丁寧に混合して 45 分間、室温でインキュベートした。細胞が接着したことを確認して、培養液を吸引して抗生物質を含まない Sf-900SFM 2 ml を加えた。溶液 A と溶液 B を混合して作製した溶液 (lipid-DNA complexes) に抗生物質を

含まない Sf900II 800  $\mu$  l を加えて丁寧に混和した。細胞から培養液を吸引し、希釈した lipid-DNA complexes 溶液を細胞に加え、27°C で 5 時間インキュベーションした。その後、トランスフェクション混合物を除き、抗生物質を含む Sf-900SFM 培養液 2 ml を加えて 27°C で 72 時間インキュベーションした。トランスフェクションから 72 時間後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを 3000 rpm, 10 分間遠心し、上清を別のチューブに保存した（この上清が一次ウイルス液となる）。

T75 培養フラスコに Sf21 細胞  $1 \times 10^7$  細胞/20ml Sf-900SFM（抗生物質入り）を入れて、27°C で 1 時間インキュベートした。細胞が接着したら一次ウイルスを 800  $\mu$  l を添加して、27°C で 48 時間培養した。48 時間後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを 3000 rpm, 10 分間遠心し、上清を別のチューブに保存する（この上清を二次ウイルス液とした）。

さらに、T75 培養フラスコに Sf21 細胞  $1 \times 10^7$  細胞/20ml Sf-900SFM（抗生物質入り）を入れて、27°C で 1 時間インキュベートした。細胞が接着したら二次ウイルス液 100  $\mu$  l を添加して、27°C で 72 時間培養した。培養後にピペッティングにより細胞を剥がし、細胞と培養液を回収した。これを 3000 rpm, 10 分間遠心し、上清を別のチューブに保存した（この上清を三次ウイルス液とした）。加えて、100 ml 用スピナーフラスコに Sf21 細胞  $6 \times 10^5$  細胞/ml 濃度で 100 ml を入れ、三次ウイルス液を 1 ml 添加して 27°C で約 96 時間培養した。培養後に、細胞及び培養液を回収した。これを 3000 rpm, 10 分間遠心し、上清を別のチューブに保存した（この上清を四次ウイルス液とした）。

#### G34 のレジン精製

上記四次ウイルス液の pFLAG-G34 上清 10ml に  $\text{NaN}_3$  (0.05 %)、NaCl (150 mM)、 $\text{CaCl}_2$  (2mM)、抗 FLAG-M1 レジン (Sigma 社) (100  $\mu$  l) を混合し、4°C で一夜攪拌した。翌日遠心して (3000 rpm 5 分、4°C) ペレットを回収し、2 mM の  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{TBS}$  を 900  $\mu$  l 加えて再度遠心分離 (2000 rpm 5 分、4°C) し、ペレットを 200  $\mu$  l の 1 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{TBS}$  に浮遊させ活性測定のサンプル (G34 酵素液) とした。この一部を SDS-PAGE による電気泳動について抗 FLAG M2-ペルオキシダーゼ (SIGMA 社製) を用いてウェスタンブロッティングを行い、目的とする



G34 タンパク質の発現を確認した。その結果約 60kDa の位置を中心としてブロードに複数のバンド（糖鎖などの翻訳後修飾の違いによるものと考えられる）が検出、発現が確認された。

## 実施例 2：ヒト G34 タンパク質の糖転移活性の探索

### 5 (1)GalNAc 転移活性のスクリーニング

G34 タンパク質の  $\beta$  1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移活性について、基質特異性、至適緩衝液、至適 pH、二価イオン要求性について検討を行った。

10 以下の反応系を用いて、G34 酵素タンパク質の GalNAc 転移活性における受容体基質特異性について検討した。

下記反応液の受容体基質には、pNp- $\alpha$ -Gal、oNp- $\beta$ -Gal、Bz- $\alpha$ -GlcNAc、pNp- $\beta$ -GlcNAc、Bz- $\alpha$ -GalNAc、pNp- $\beta$ -GalNAc、pNp- $\alpha$ -Glc、pNp- $\beta$ -Glc、pNp- $\beta$ -GlcA、pNp- $\alpha$ -Fuc、pNp- $\alpha$ -Xyl、pNp- $\beta$ -Xyl および pNp- $\alpha$ -Man（すべて Sigma 社）を各々 10 nmol として用いた。ここで「Gal」とは D-ガラクトース残基を示し、「Xyl」とは D-キシロース残基を示し、「Fuc」とは D-フコース残基を示し、「Man」とは D-マンノース残基を示す。「GlcA」はグルクロン酸残基を示す。

20 反応液（カッコ内は最終濃度）は、基質（10 nmol）、MES（2-モルフォリノエタンスルホン酸）（pH 6.5、50mM）、MnCl<sub>2</sub>（10 mM）Triton X-100（商品名）（0.1 %）、UDP-GalNAc（2 mM）および UDP-[<sup>14</sup>C]GlcNAc（40 nCi）を混和し、これに G34 酵素液を 5  $\mu$ l 加えて、さらに H<sub>2</sub>O を加えて全量 20  $\mu$ l とした（表 1 参照）。

表 1

反応液の組成 ( $\mu$ l)

	E (+), D (+):	X8	E (-), D (+):	E (+), D (-)
酵素液	5:	40:	0:	5
140 mM HEPES pH7.4	2:	16:	2:	2
100 mM UDP-GalNAc	0.5:	4:	0.5:	0
200 mM MnCl <sub>2</sub>	1:	8:	1:	1
10% Triton CF-54	0.6:	4.8:	0.6:	0.6
H <sub>2</sub> O	5.9:	47.2:	10.9:	6.4
10 nmol/ $\mu$ l Acceptor	5:	40:	5:	5
Total	20:		20:	20

上記反応混合液を 37℃で 16 時間反応させ、反応終了後、H<sub>2</sub>O を 200  $\mu$ l 加え、軽く遠心後上清を取得した。1 ml のメタノールで 1 回洗浄後、1 ml の H<sub>2</sub>O で 2 回洗浄して平衡化した Sep-Pak plus C18 Cartridge (Waters 社製) に該上清  
5 を通し、上清中の基質および生成物をカートリッジに吸着させた。1 ml の H<sub>2</sub>O にて 2 回カートリッジを洗浄後、1 ml のメタノールで吸着した基質および生成物を溶出した。溶出液を 5 ml の液体シンチレーター ACSII (アマシャムバイオサイエンス社製) と混和し、シンチレーションカウンター (ベックマン・コールター社製) にて放射線の量を測定した。

10 その結果、G34 タンパク質は、pNp- $\beta$ -GlcNAc に GalNAc を転移させる活性を有する GalNAc 転移酵素であることが判明した。また、当該酵素活性は、UDP-GlcNAc を供与体基質とし Bz- $\beta$ -GlcNAc を受容体基質としたとき、少なくとも 0 ~16 時間の反応時間経過に伴いリニアに上昇した (表 2 及び図 1 参照)。

表 2

反応時間	Area (%)
1時間	0
2時間	2.388
4時間	6.195
16時間	13.719

## 20 結合形式の決定

G34 酵素タンパク質により合成される糖鎖構造について、その結合形式を NMR により解析した。

15 先ず反応液 (カッコ内は最終濃度) は Bz- $\beta$ -GlcNAc (640 nmol) を受容体基質として、HEPES 緩衝液 (pH 7.4、14 mM) 、Triton CF-54 (商品名) (0.3 %)、  
25 UDP-GalNAc (2 mM)、MnCl<sub>2</sub> (10 mM) 及び G34 酵素液 500  $\mu$ l 加えた。さらに H<sub>2</sub>O を加えて全量 2 ml とした。この反応液を 37℃にて 16 時間反応させた。反応液を 5 分間、95℃で加温することで反応を停止し、Ultrafree-MC (ミリポア社) によりろ過精製した。

一回の展開に 50  $\mu$ l のろ液を逆相カラム ODS-80Ts QA (4.6 $\times$ 250 mm、東ソ

一株式会社) を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。展開溶媒として 9%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を用いた。溶出条件は 1 ml/分、40℃とした。溶出ピークの検出は 210 nm における吸光度を指標とし、SPD-10A<sub>vp</sub> (島津製作所) を使用した。その結果、対照にはみられなかった新たな溶出ピークが認められた。このピークを分取し、凍結乾燥後、NMR の試料として用いた。

NMR は DMX750 (ブルッカーダルトニクス社) を用いて行った。その結果、試料は GalNAc と GlcNAc- $\beta$ 1-o-Bz が  $\beta$ 1-3 結合したものであると判断された (図 2 A 及び図 2 B 参照)。このように判断した根拠として以下の点が挙げられる (図 2 A 及び図 2 B と共に図 3 及び 4 を参照されたい)。a) 2つの残基 (A、B とする) の一位の信号のピストン結合定数が共に 8.4 Hz であり、2つのピラノースは  $\beta$  型である。b) 図 3 中にスピン結合定数が示されるが、A はグルコースに特徴的なスピン結合定数を示し、B はガラクトースに特徴的なスピン結合定数を示す。c) ベンジルのメチレンプロトンと A 1 プロトンの間に NOE が見られたために A がベンジルの結合した残基であると分かる。d) N-アセチルのメチルの信号が 2 つあり、2 つの残基が N-アセチル化された糖であることが分かる。e) NOESY に B1-A3 の NOE が存在する。

他方、上記酵素活性に関与するモチーフ配列についての検討も行った。

図 5 は、G34 タンパク質の推定アミノ酸配列 (配列番号 2) と各種のヒト  $\beta$ 1-3Gal 転移酵素 ( $\beta$ 3Gal-T1~T6) のアミノ酸配列との対比を示す。図 5 中、枠で囲まれた部分は Gal 転移酵素に共通するモチーフを示すが、そのうち、M1~3 の枠で囲まれた 3 つのモチーフは  $\beta$ 1, 3 結合性糖転移酵素に共通するモチーフである。また同図中の \* 印は、比較された配列間で保存されているアミノ酸残基を示す。

図 6 は、各種  $\beta$ 1-3GlcNAc 転移酵素 ( $\beta$ 3Gn-T2~T5) 及びヒト Gal 転移酵素 T1~T3, T5, T6 との間で、 $\beta$ 1, 3 結合形成能に関与する 3 つのモチーフ (図 5 の前記 M1~3 のモチーフに相当する) における対比を示している。同図中の \* 印は、比較された配列間で保存されているアミノ酸残基を示す。

図 5 及び図 6 で示されるように、G34 タンパク質のアミノ酸配列は、公知の各

種  $\beta$  1, 3 結合性糖転移酵素のアミノ酸配列との対比において、 $\beta$  1, 3 結合に関するモチーフ (M1 ~ 3) をすべて有すると言えるだけの保存性を有していることが分かった。

- 5 かくして、G34 タンパク質が GlcNAc に GalNAc を  $\beta$  1, 3 のグリコシド結合で転移する活性を有するとの結論はモチーフに関する検討からも支持された。

#### 至適緩衝液および至適 pH

以下の反応系を用いて、G34 の GalNAc 転移活性における至適緩衝液および至適 pH について検討した。受容体基質は pNp- $\beta$ -GlcNAc を用いた。

- 10 緩衝液 (カッコ内は最終濃度) は MES (2-モルフォリノエタンスルホン酸) 緩衝液 (pH 5.5、5.78、6.0、6.5 および 6.75、50 mM)、カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0、5.6、6.0、6.2、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4 および 7.5、25 mM) および N-[2-ヒドロキシエチル] ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸 (HEPES) 緩衝液 (pH 6.75、7.00、7.30、7.40 および 7.50、14 mM) のいずれかを用いた。基質 (10 nmol)、MnCl<sub>2</sub> (10 mM)、Triton CF-54 (商品名)
- 15 (0.3%)、UDP-GalNAc (2 mM) および UDP-[<sup>14</sup>C]GlcNAc (40 nCi) これに G34 酵素液を 5  $\mu$  l 加えて、さらに H<sub>2</sub>O を加えて全量 20  $\mu$  l とした。

- 20 上記反応混合液を 37°C で 16 時間反応させ、反応終了後、H<sub>2</sub>O を 200  $\mu$  l 加え、軽く遠心後上清を取得した。1 ml のメタノールで 1 回洗浄後、1 ml の H<sub>2</sub>O で 2 回洗浄して平衡化した Sep-Pak plus C18 Cartridge (Waters 社製) に該上清を通し、上清中の基質および生成物をカートリッジに吸着させた。1 ml の H<sub>2</sub>O にて 2 回カートリッジを洗浄後、1 ml のメタノールで吸着した基質および生成物を溶出した。溶出液を 5 ml の液体シンチレーター ACSII (アマシャムバイオサイエンス社製) と混和し、シンチレーションカウンター (ベックマン・コールター社製) にて放射線の量を測定した。

- 25 その結果 (表 3 及び図 7 参照) から、MES 緩衝液においては検討した範囲では pH 5.50 と pH 5.78 で同等の強い活性を示し、pH 6.5 まで pH 依存的に低下し、pH 6.75 で強い活性を示した。カコジル酸ナトリウム緩衝液において検討した範囲では pH 5.0 で最も活性が高く、pH 6.2 まで pH 依存的に活性が低下し、さらに pH 7.0 まで pH 依存的に強くなり、pH 7.4 までプラトーとなった。HEPES 緩

衝液においては検討した範囲では pH 依存的に活性が増強し、pH7.4 ないし 7.5 で最も強い活性を示した。これらの中で HEPES 緩衝液 pH 7.4 ないし 7.5 が最も強い活性を示した。

表 3

pH	+	-	カルジコル酸ナトリウム
5.0	6042	204	5838
5.6	3353	159	3194
6.0	2689	260	2429
6.2	907	138	769
6.6	1093	136	957
6.8	2488	258	2230
7.0	4965	259	4706
7.2	4377	309	4068
7.4	4930	304	4626
pH	+	-	MES
5.50	3735	197	3538
5.78	3755	184	3571
6.00	2514	141	2373
6.50	1981	734	1247
6.75	3289	136	3153
pH	+	-	HEPES
6.75	4894	149	4745
7.00	4912	121	4791
7.30	4294	127	4167
7.40	6630	120	6510
7.50	6895	240	6655

以下の反応系を用いて二価イオンの要求性について検討した。受容体基質は Bz- $\beta$ -GlcNAc を用いた。

反応液（カッコ内は最終濃度）は、基質（10 nmol）、HEPES 緩衝液（pH 7.4、14 mM）、Triton CF-54（商品名）（0.3 %）、UDP-GalNAc（2 mM）および UDP-[ $^{14}$ C]GlcNAc（40 nCi）、G34 酵素液 5  $\mu$ l 加えた。これに MnCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub> または CoCl<sub>2</sub> を 2.5 mM、5 mM、10 mM、20 mM および 40 mM 添加し、さらに H<sub>2</sub>O を加えて全量 20  $\mu$ l とした。

上記反応混合液を 37°C で 16 時間反応させ、反応終了後、H<sub>2</sub>O を 200  $\mu$ l 加え、軽く遠心後上清を取得した。1 ml のメタノールで 1 回洗浄後、1 ml の H<sub>2</sub>O で 2 回洗浄して平衡化した Sep-Pak plus C18 Cartridge（Waters 社製）に該上清を通し、上清中の基質および生成物をカートリッジに吸着させた。1 ml の H<sub>2</sub>O にて 2 回カートリッジを洗浄後、1 ml のメタノールで吸着した基質および生成

物を溶出した。溶出液を 5 ml の液体シンチレーター ACSII (アマシャムバイオサイエンス社製) と混和し、シンチレーションカウンター (ベックマン・コールター社製) にて放射線の量を測定した。

その結果 (表 4 及び図 8 参照) から、各二価イオン添加により活性は増強し、G34 タンパク質は二価イオン要求性の酵素であることが確認された。その活性は Mn および Co で 5 nM 以上、Mg で 10 nM 以上の濃度でほぼプラトーであった。また、Mn による活性の増強は Cu の添加により完全に消失した。

表 4

RIAアッセイ(二価イオン要求性)

金属イオン	濃度(mM)	DPM
Mn	2.5	7260.09
	5	8270.23
	10	7748.77
	20	7515.86
	40	4870.48
	40	371.53
Co	2.5	10979.99
	5	9503.91
	10	10979.99
	20	8070.47
	40	7854.92
Mg	2.5	4800.03
	5	8692.15
	10	8980.56
	20	6726.32
	40	5592.88
none	-	2427.39
EDTA	20	149.32
Mn+Cu	10 + 10	293
none	-	155.64

#### オリゴ糖に対する基質特異性

以下の反応系を用いてオリゴ糖に関する受容体基質特異性について検討した。受容体基質は pNp- $\alpha$ -Gal、oNp- $\beta$ -Gal、Bz- $\alpha$ -GlcNAc、Bz- $\beta$ -GlcNAc、Bz- $\alpha$ -GalNAc、pNp- $\beta$ -GalNAc、pNp- $\alpha$ -Glc、pNp- $\beta$ -Glc、pNp- $\beta$ -GlcA、pNp- $\alpha$ -Fuc、pNp- $\alpha$ -Xyl、pNp- $\beta$ -Xyl、pNp- $\alpha$ -Man、ラクトシド-Bz、Lac-セラミド、Gal-セラミド、パラグロボシド、グロボシド、Gal- $\beta$ 1-4 GalNAc- $\alpha$ -pNp、Gal- $\beta$ 1-3 GlcNAc- $\beta$ -pNp、GlcNAc- $\beta$ 1-4 GlcNAc  $\beta$ -Bz、pNp-core1 (Gal- $\beta$ 1-3 GalNAc- $\alpha$ -pNp)、pNp-core2 (Gal- $\beta$ 1-3 (GlcNAc- $\beta$ 1-6) GalNAc- $\alpha$ -pNp)、pNp-core3 (GlcNAc- $\beta$ 1-3 GalNAc- $\alpha$ -pNp) および pNp-core6 (GlcNAc- $\beta$ 1-6

GalNAc- $\alpha$ -pNp)を用いた。なお「Lac」とはD-ラクトース残基を示す。

反応液（カッコ内は最終濃度）は基質(50 nmol)、HEPES 緩衝液（pH 7.4、14 mM）、Triton CF-54(商品名)（0.3 %）、UDP-GalNAc（2 mM）、MnCl<sub>2</sub>（10 mM）、UDP-[<sup>3</sup>H]GlcNAc および G34 酵素液 5  $\mu$  l 加えた。さらに H<sub>2</sub>O を加えて全量

5 20  $\mu$  l とした。

上記反応混合液を 37°C で 2 時間反応させ、反応終了後、H<sub>2</sub>O を 200  $\mu$  l 加え、軽く遠心後上清を取得した。1 ml のメタノールで 1 回洗浄後、1 ml の H<sub>2</sub>O で 2 回洗浄して平衡化した Sep-Pak plus C18 Cartridge (Waters 社製) に該上清を通し、上清中の基質および生成物をカートリッジに吸着させた。1 ml の H<sub>2</sub>O に  
10 て 2 回カートリッジを洗浄後、1 ml のメタノールで吸着した基質および生成物を溶出した。溶出液を 5 ml の液体シンチレーター ACSII（アマシャムバイオサイエンス社製）と混和し、シンチレーションカウンター（ベックマン・コールター社製）にて放射線の量を測定した。

その結果を Bz- $\beta$ -GlcNAc を基質に用いたときの放射活性を 100% とし、比較した（表 5 参照）。pNp-core2 を基質としたときに最も放射活性の上昇が認められた。ついで Bz- $\beta$ -GlcNAc、GlcNAc- $\beta$ 1-4-GlcNAc- $\beta$ -Bz、pNp-core6、pNp-core3 の順に放射活性の上昇が認められた。その他の基質には放射活性の上昇は認められなかった。

20

25

表 5

No.	受容体基質	%
1	pNp- $\alpha$ -Gal	N.D.
2	oNp- $\beta$ -Gal	N.D.
3	Bz- $\alpha$ -GlcNAc	N.D.
4	Bz- $\beta$ -GlcNAc	100
5	Bz- $\alpha$ -GalNAc	N.D.
6	pNp- $\beta$ -GalNAc	N.D.
7	pNp- $\alpha$ -Glc	N.D.
8	pNp- $\beta$ -Glc	N.D.
9	pNp- $\beta$ -GlcA	N.D.
10	pNp- $\alpha$ -Fuc	N.D.
11	pNp- $\alpha$ -Xyl	N.D.
12	pNp- $\beta$ -Xyl	N.D.
13	pNp- $\alpha$ -Man	N.D.
14	ラクトシド-Bz	N.D.
15	Lac-セラミド	N.D.
16	Gal-セラミド	N.D.
17	パラグロボシド	N.D.
18	グロボシド	N.D.
19	Gal $\beta$ 1-4GalNAc- $\alpha$ -pNp	N.D.
20	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc- $\beta$ -pNp	N.D.
21	GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc- $\beta$ -Bz	29
22	core1-pNp	N.D.
23	core2-pNp	185
24	core3-pNp	8
25	core6-pNp	19

N.D.: 放射活性が無かったため不特定

core1: Gal- $\beta$  1-3-GalNAc- $\alpha$ -pNp

core2: Gal- $\beta$  1-3-(GlcNAc- $\beta$  1-6) GalNAc- $\alpha$ -pNp

core3: GlcNAc- $\beta$  1-3- GalNAc- $\alpha$ -pNp

core6: GlcNAc- $\beta$  1-6-GalNAc- $\alpha$ -pNp

## (2) HPLC 分析法による活性の確認

糖残基供与体基質としてウリジン二リン酸-N-アセチルガラクトサミン (UDP-GalNAc: シグマ-アルドリッチ社)、糖残基受容体基質として Bz- $\beta$ -GlcNAc を使用して、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による G34 の酵素活性の分析を行った。

反応液 (カッコ内は最終濃度) は、Bz- $\beta$ -GlcNAc (10 nmol)、HEPES 緩衝液 (pH 7.4、14 mM)、Triton CF-54 (商品名) (0.3 %)、UDP-GalNAc (2 mM)、MnCl<sub>2</sub> (10 mM) 及び G34 酵素液 10  $\mu$  l を加えた。さらに H<sub>2</sub>O を加えて全量 20  $\mu$  l とした。この反応液を 37°C にて 16 時間反応させた。反応液に H<sub>2</sub>O を 100  $\mu$  l 加えることで反応を停止し、Ultrafree-MC (ミリポア社) によりろ過精製した。

10  $\mu$  l のろ液を逆相カラム ODS-80Ts QA (4.6 $\times$ 250 mm、東ソー株式会社) を



用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。展開溶媒として 9% アセトニトリル-0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を用いた。溶出条件は 1 ml/分、40°C とした。溶出ピークの検出は 210 nm における吸光度を指標とし、SPD-10A<sub>vp</sub> (島津製作所) を使用した。

- 5      その結果、対照にはみられなかった新たな溶出ピークが認められた。

### (3) 質量分析法による反応生成物の分析

上述のピークを回収し、質量分析法による反応生成物の分析を行った。マトリックス支援レーザーイオン化-飛行時間質量分析 (MALDI-TOF-MS) は Reflex IV (ブルッカーダルトニクス社) を使用して行った。MALDI-TOF-MS 用の試料は 10  
10      pmol の試料を乾燥させ、1  $\mu$ l の蒸留水に溶解して使用した。

その結果、538.194 m/z のピークが観察された。このピークは GalNAc-GlcNAc-Bz (ナトリウム塩) の分子量に相当していた。

この結果からも、G34 酵素タンパク質は、Bz- $\beta$ -GlcNAc に対し GalNAc を転移することが明らかとなった。

## 15      実施例 3 : ヒト G34 の mRNA 発現量の測定

### (1) 各種ヒト正常組織における発現量

定量的リアルタイム PCR 法を用いてヒト正常組織内の G34 の mRNA 発現量を比較した。ここで定量的リアルタイム PCR 法とは、PCR においてセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーに加え、蛍光標識されたプローブを組み合わせる方法  
20      である。PCR により増幅する際、プローブの蛍光標識が外れて蛍光を示す。蛍光強度が遺伝子の増幅に相関して増幅するためこれを指標として定量が行われる。

各ヒト正常組織の RNA (クロンテック社) を RNeasy Mini Kit (キアゲン社製) で抽出し、Super-Script First-Strand Synthesis System (インビトロジェン社製) を用いた oligo (dT) 法により single strand DNA とした。この DNA を  
25      鋳型として用いて 5' プライマー (配列番号 14) と 3' プライマー (配列番号 15) 及び TaqMan プローブ (配列番号 16) を用いて ABI PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン社製) により定量的リアルタイム PCR を行った。PCR の条件は 50°C 2 分、95°C 10 分で反応させた後、95°C 15 秒、60°C 1

分を 50 回繰り返した。検量線は pFLAG-CMV3 (インビトロジェン社) に G34 の部分配列を導入したプラスミド DNA を鋳型として用い、上述の方法により PCR を行って作成した。

その結果から、精巣で特異的に高い発現が確認され、次いで骨格筋、前立腺の

5 順に高い発現が認められた (表 6)。

表 6

ヒト正常組織における G34 の mRNA 発現量

組織	コピー数(X10000/μg, 総 RNA)	標準誤差
脳	5.0	1.1
胎児脳	10.3	0.7
小脳	2.8	0.3
延髄	4.9	0.3
顎下腺	6.7	0.4
甲状腺	1.8	0.6
気管	3.9	0.3
肺	0.4	0.1
心臓	0.1	0.1
骨格筋	25.8	1.1
小腸	5.1	0.3
大腸	0.6	0.3
肝臓	0.3	0.1
胎児肝臓	0.7	0.3
膵臓	4.2	1.1
腎臓	1.6	0.3
副腎	10.8	1.3
胸腺	4.8	0.2
骨髄	3.1	0.4
脾臓	4.2	0.3
精巣	115.5	2.0
前立腺	14.6	1.5
乳腺	5.2	0.2
子宮	5.0	0.2
胎盤	1.4	0.4

## (2) ヒト癌細胞株における発現量

上述の定量的リアルタイム PCR 法を用いて各種癌由来のヒト細胞株内での G34 の mRNA 発現量を比較した。各ヒト細胞株の細胞を回収した後、RNA を RNeasy Mini Kit (キアゲン社製) で抽出し、Super-Script First-Strand Synthesis System (インビトロジェン社製) を用いた oligo (dT) 法により single strand DNA とした。この DNA を鋳型として用いて 5' プライマー (配列番号 14) と 3' プライマー (配列番号 15) 及び TaqMan プローブ (配列番号 16) を用い

て ABI PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン社製) により定量的リアルタイム PCR を行った。PCR の条件は 50℃ 2 分、95℃ 10 分で反応させた後、95℃ 15 秒、60℃ 1 分を 50 回繰り返した。

その結果、全てのヒト細胞株で発現が認められた (表 7、図 9)。

表 7

ヒト細胞株における G34 の mRNA 発現量

	細胞株	コピー数 ( $\times 10^4/\mu\text{g}$ , 総 RNA)		細胞株	コピー数 ( $\times 10^4/\mu\text{g}$ , 総 RNA)		
神経芽腫	SCCH-26	7.9	0.6	食道癌	ES1	23.0	2.5
	NAGAI	19.5	1.5		ES2	16.1	0.6
	NB-9	40.6	2.3		ES6	42.8	3.0
	SK-N-SH	14.9	0.7	胃癌	MKN1	6.2	1.1
	SK-N-MC	5.8	0.5		MKN28	8.6	1.0
	NB-1	20.9	0.5		MKN7	9.7	0.1
	IMR32	21.0	0.2		MKN74	3.5	0.8
神経膠腫	T98G	6.2	0.2		MKN-45	7.3	2.1
	YKG-1	3.9	0.0		HSC-43	42.8	1.7
	A172	13.4	0.9	KATOIII	6.4	0.4	
	GI-1	13.7	1.3	TMK-1	10.8	1.2	
	U118MG	6.8	0.5	LSC	11.8	0.6	
	U251	28.9	1.9	LSB	4.9	0.3	
肺癌	KG-1-C	9.1	0.6	SW480	10.1	0.4	
	Lu130	6.8	0.4	SW1116	24.1	1.4	
	Lu134A	30.3	1.2	Colo201	10.4	0.4	
	Lu134B	6.8	0.4	Colo205	6.8	0.9	
	Lu135	7.2	1.3	C1	21.9	1.2	
	Lu139	10.7	0.5	WiDr	1.2	0.0	
	Lu140	15.4	1.8	HCT8	82.2	6.2	
	SBC-1	2.5	0.2	HCT15	12.1	1.0	
	PC-7	9.1	0.2	A204	67.9	4.4	
	PC-9	22.4	0.1	A-431	30.6	2.5	
	HAL-8	15.2	1.2	SW1736	11.9	1.1	
	HAL-24	20.8	1.7	HepG2	2.3	0.3	
	ABC-1	10.3	0.9	Capan-2	19.4	1.2	
	RERF-LC-MC	22.8	2.2	293T	55.1	8.3	
	EHHA-9	20.3	7.9	PA-1	3.5	0.6	
	PC-1	2.1	0.2	HL-60	2.1	0.1	
	EBC-1	4.4	0.2	K-562	17.1	1.8	
	PC-10	118.8	4.9	リンパ腫	Daudi	2.4	0.2
	A549	27.1	2.6		Namalwa	13.0	1.2
	LX-1	30.7	2.1		KHM-IB	16.4	0.4
					Ramos	9.5	0.7
					Raji	11.6	1.3
			Jurkat		42.7	1.9	

### (3) 癌化組織における発現量

上述の定量的リアルタイム PCR 法を用いて大腸癌及び肺癌の患者由来の癌組織及びその周辺の正常組織における G34 の mRNA 発現量を比較した。

癌組織と同一患者の正常組織の RNA を RNeasy Mini Kit (キアゲン社製) で抽出し、Super-Script First-Strand Synthesis System (インビトロジェン社製) を用いた oligo (dT) 法により single strand DNA とした。この DNA を鋳型として用いて 5' プライマー (配列番号 1 4) と 3' プライマー (配列番号 1 5) 及び TaqMan プローブ (配列番号 1 6) を用いて ABI PRISM 7700 (アプライドバイオシステムズジャパン社製) により定量的リアルタイム PCR を行った。PCR の条件は 50℃ 2 分、95℃ 10 分で反応させた後、95℃ 15 秒、60℃ 1 分を 50 回繰り返した。得られた数値は個体間のばらつきを補正するため内標準遺伝子としてアプライドバイオシステムズジャパン社製のキットを用いて定量した  $\beta$ -actin により除し、比較を行った。

その結果、それら癌化組織内では G34 遺伝子の mRNA 発現量が有意に増加していることが明らかとなった (表 8、表 9)。

表 8

大腸癌患者組織における G34 の mRNA 発現量

患者番号	正常組織	標準誤差	癌組織	標準誤差	変化率
1	0.15	0.04	0.35	0.07	2.3
2	0.15	0.07	8.63	0.65	58.0
3	0.07	0.02	1.55	0.15	23.5
4	0.08	0.05	1.82	0.26	22.0
5	0.08	0.02	0.60	0.07	7.2
6	1.04	0.08	1.92	0.21	1.8
7	0.07	0.02	5.37	1.06	81.3
8	1.54	0.27	8.30	0.96	5.4
9	0.05	0.04	1.70	0.37	34.3
10	0.05	0.04	0.10	0.04	2.0
11	0.60	0.29	10.23	1.47	17.2
12	0.17	0.13	2.36	0.43	14.3
13	0.18	0.09	1.70	0.27	9.4
14	0.18	0.08	2.76	0.23	15.2
15	0.18	0.05	3.49	0.34	19.2
16	0.20	0.15	1.84	0.25	9.3
17	0.28	0.05	7.41	0.51	26.4
18	0.05	0.04	5.92	0.38	119.3
19	0.15	0.11	4.68	0.67	31.4
20	0.13	0.06	4.61	2.22	34.9
21	0.02	0.02	8.40	1.65	508.0
22	0.20	0.07	3.57	0.43	18.0
23	0.55	0.27	2.33	1.23	4.3
平均	0.25	0.07	3.97	0.55	15.6

コピー数 (X 1 0 0 0 0 /  $\mu$ g, 総 RNA)

表 9

肺癌患者組織における G34 の mRNA 発現量

患者番号	正常組織	標準誤差	癌組織	標準誤差	変化率
1	0.48	0.06	2.03	0.27	4.2
3	0.00	0.00	0.55	0.21	—
4	2.43	0.40	6.13	0.17	2.5
5	0.10	0.04	2.74	0.32	27.7
6	1.69	0.28	3.11	0.69	1.8
7	0.60	0.16	2.76	0.35	4.6
8	2.30	0.38	6.23	0.21	2.7
9	1.26	0.27	2.51	0.10	2.0
10	1.47	0.18	4.76	0.57	3.2
11	0.64	0.00	1.14	0.11	1.8
12	0.56	0.06	0.69	0.04	1.2
13	1.32	0.02	1.98	0.15	1.5
14	0.17	0.02	0.66	0.02	4.0
15	0.71	0.05	2.71	0.13	3.8
16	1.07	0.13	15.64	1.11	14.6
17	1.03	0.12	8.27	0.73	8.1
18	0.13	0.02	1.95	0.09	14.8
平均	0.94	0.71	3.76	3.64	4.0

コピー数 (X 10000 /  $\mu$ g, 総RNA)

## 実施例 4 : マウス G34 遺伝子のクローニングと発現

実施例 1 で得られたヒト G34 の配列をクエリーとしてアプライドバイオシステムズ社のマウス遺伝子配列 serela に対して検索を行った結果、高いホモロジーを有する対応核酸配列を見出した。この核酸配列から予測されるオープンリーディングフレーム (ORF) は 1515 bp (配列番号 3)、アミノ酸配列にして 504 アミノ酸 (配列番号 4) からなり、N 末端に糖転移酵素の特徴である疎水アミノ酸領域を有する。ヒト G34 (配列番号 1 及び 2) との相同性は核酸配列で 86%、アミノ酸配列で 88% である (図 10 参照)。また、 $\beta$ 3GalT ファミリーが保持している 3 つのモチーフ全てを保持している。我々は、配列番号 3 の核酸配列及び配列番号 4 のアミノ酸配列がコードするものをマウス G34 (mG34) と命名した。

mG34 の活性を調べるために G34 を哺乳類由来細胞株で発現させた。本実施例では、mG34 の 35 番アミノ酸から C 末端までの活性領域を FLAG Protein Expression System (シグマアルドリッチ社) により哺乳類由来細胞株発現ベク

ターpFLAG-CMV3 に遺伝子導入した。

マウス組織における発現を PCR 法により確認した。マウス組織（脳、胸腺、胃、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、精巣及び骨格筋）を鋳型とし、5' プライマー（mG34-CMV-F1：配列番号 1 7）と 3' プライマー（mG34-CMV-R1：配列番号 1 8）を用いて PCR 反応を行った。PCR 法は 98℃ 10 秒、55℃ 30 秒、72℃ 2 分を 25 回繰り返す条件で行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動を行い、約 1500 bp のバンドを確認した。その結果、表 1 0 に示されるように、精巣での発現が最も高く、ついで脾臓及び骨格筋の順に発現が認められた。

表 1 0

マウス組織における mG34 の mRNA 発現量

組織	発現量
脳	±
胸腺	—
胃	+
小腸	—
大腸	+
肝臓	+
膵臓	—
脾臓	—
腎臓	++
精巣	+++
骨格筋	++

マウス精巣から得られた cDNA を鋳型とし 5' プライマー（mG34-CMV-F1：配列番号 1 7）と 3' プライマー（mG34-CMV-R1：配列番号 1 8）を用いて PCR 反応を行い目的の DNA 断片を得た。PCR 法は 98℃ 10 秒、55℃ 30 秒、72℃ 2 分を 25 回繰り返す条件で行った。そして PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、ゲル切り出し法でゲルを切り出して定法により単離した。この PCR 産物は制限酵素サイトとして 5' 側に HindIII、3' 側に NotI を有する。

この DNA 断片と pFLAG-CMV3 を、各々制限酵素である HindIII 及び NotI にて処理した後、反応液を混合し、ライゲーション反応を行うことで pFLAG-CMV3 に

導入した。反応液をエタノール沈殿法により精製した後、コンピテントセル（大腸菌 DH5  $\alpha$ ）と混合し、ヒートショック法（42°C、30 秒）を行い、アンピシリンを含む LB 寒天培地に播いた。

- 翌日得られたコロニーを、直接 PCR で目的 DNA を確認した。さらに確実に期  
5 すためシーケンシングにより DNA 配列の確認をした後、ベクター（pFLAG-CMV3-mG34A）を抽出・精製した。

- ヒト腎臓細胞由来細胞株 293T 細胞  $2 \times 10^6$  個を抗生物質を含まない 10%ウシ胎児血清入りの DMEM 培地（インビトロジェン社）10 ml にて懸濁し、10 cm ディッシュに播き、16 時間 37°C にて CO<sub>2</sub> インキュベータにて培養した。pFLAG-CMV3-mG34A の 20 ng 及び Lipofectamin 2000（インビトロジェン社）30  $\mu$ l を OPTI-MEM（インビトロジェン社）1.5 ml と各々混和し、室温にて 5 分間インキュベーションした。更に二つの液を緩やかに混和し、室温にて 20 分間インキュベーションした。この混合液をディッシュに滴下し、48 時間 37°C にて CO<sub>2</sub> インキュベータにて培養した。

- 15 上清 10ml に NaN<sub>3</sub>（0.05 %）、NaCl（150 mM）、CaCl<sub>2</sub>（2 mM）、抗 M1 レジン（Sigma 社）（100  $\mu$ l）を混合し、4°C で一夜攪拌した。翌日遠心して（3000 rpm 5 分、4°C）ペレットを回収し、2 mM の CaCl<sub>2</sub>・TBS を 900  $\mu$ l 加えて再度遠心分離（2000 rpm 5 分、4°C）し、ペレットを 200  $\mu$ l の 1 mM CaCl<sub>2</sub>・TBS に浮遊させ活性測定のサンプル（マウス G34 酵素液）とした。この一部を SDS-PAGE に  
20 による電気泳動について抗 FLAG M2-ペルオキシダーゼ（SIGMA 社製）を用いてウェスタンブロッティングを行い、目的とする mG34 タンパク質の発現を確認した。その結果、約 60kDa の位置にバンドが検出、発現が確認された。

#### 実施例 5：マウス G34 の糖転移活性の探索

- 以下の反応系を用い、マウス G34 の  $\beta$ 1,3-N-アセチルガラクトサミン転移  
25 活性における基質特異性について検討した。下記反応液の「受容体基質」には、pNp- $\alpha$ -Gal、oNp- $\beta$ -Gal、Bz- $\alpha$ -GlcNAc、Bz- $\beta$ -GlcNAc、Bz- $\alpha$ -GalNAc、pNp- $\beta$ -GalNAc、pNp- $\alpha$ -Glc、pNp- $\beta$ -Glc、pNp- $\beta$ -GlcA、pNp- $\alpha$ -Fuc、pNp- $\alpha$ -Xyl、pNp- $\beta$ -Xyl、pNp- $\alpha$ -Man、ラクトシド-Bz、Lac-セラミド、Gal-セラミド、Gb3、グロボシド、Gal- $\beta$ 1-4GalNAc- $\alpha$ -pNp、Gal  $\beta$ 1-3GlcNAc- $\beta$ -Bz、GlcNAc-

$\beta$  1-4-GlcNAc- $\beta$ -Bz、core1-pNp、core2-pNp、core3-pNp および core6-pNp (すべて Sigma 社) を各々 10 nmol として用いた。

反応液 (カッコ内は最終濃度) は基質 (10 nmol)、HEPES (N- [2-ヒドロキシエチル] ピペラジーン-N' - [2-エタンスルホン酸]) (pH 7.4、14 mM)、  
5 MnCl<sub>2</sub> (10 mM) Triton CF-54 (商品名) (0.3 %)、UDP-GalNAc (2 mM) および UDP-[<sup>14</sup>C]GlcNAc (40 nCi) を混和し、これにマウス G34 酵素液を 5  $\mu$  l 加えて、さらに H<sub>2</sub>O を加えて全量 20  $\mu$  l とした。

上記反応混合液を 37°C で 16 時間反応させ、反応終了後、H<sub>2</sub>O を 200  $\mu$  l 加え、軽く遠心後上清を取得した。1 ml のメタノールで 1 回洗浄後、1 ml の H<sub>2</sub>O で  
10 2 回洗浄して平衡化した Sep-Pak plus C18 Cartridge (Waters 社製) に該上清を通し、上清中の基質および生成物をカートリッジに吸着させた。1 ml の H<sub>2</sub>O にて 2 回カートリッジを洗浄後、1 ml のメタノールで吸着した基質および生成物を溶出した。溶出液を 5 ml の液体シンチレーター ACSII (アマシャムバイオサイエンス社製) と混和し、シンチレーションカウンター (ベックマン・コール  
15 ター社) にて放射線の量を測定した。

その結果は、Bz- $\beta$ -GlcNAc を基質に用いたときの放射活性を 100% として比較した (表 1 1)。Bz- $\beta$ -GlcNAc を基質としたときに最も放射活性の上昇が認められた。ついで core2-pNp、core6-pNp、core3-pNp、pNp- $\beta$ -Glc、GlcNAc- $\beta$  1-4-GlcNAc- $\beta$ -Bz の順に高い放射活性が認められた。その他の基質には放射活性  
20 の上昇は認められなかった。



表 1 1

受容体基質	%
pNp- $\alpha$ -Gal	ND
oNp- $\beta$ -Gal	ND
Bz- $\alpha$ -GlcNAc	ND
Bz- $\beta$ -GlcNAc	100
Bz- $\alpha$ -GalNAc	ND
pNp- $\beta$ -GalNAc	ND
pNp- $\alpha$ -Glc	ND
pNp- $\beta$ -Glc	12
pNp- $\beta$ -GlcA	ND
pNp- $\alpha$ -Fuc	ND
pNp- $\alpha$ -Xyl	ND
pNp- $\beta$ -Xyl	ND
pNp- $\alpha$ -Man	ND
ラクトシド-Bz	ND
Lac-セラミド	ND
Gal-セラミド	ND
Gb3	ND
グロボシド	ND
Gal $\beta$ 1-4GalNAc- $\alpha$ -pNp	ND
Gal $\beta$ 1-3GlcNAc- $\beta$ -pNp	ND
GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc- $\beta$ -Bz	10
core1-pNp	ND
core2-pNp	25
core3-pNp	14
core6-pNp	18

#### 実施例 6 : マウス精巣に対する in situ ハイブリダイゼーション

マウス精巣由来の試料に mG34 を使用した in situ ハイブリダイゼーションを行い、マウス精巣試料における mG34 の発現を確認した (図 1 1 参照)。

#### 実施例 7 : G34 ノックアウトマウスの作製

ノックアウトしたい遺伝子 (mG34) の活性化ドメインを含む exon (mG34 の場合には ORF 部分の 3 番目から 12 番目の exon (1242 bp) ) を含む約 10 kb 断片を中心とした染色体断片 (約 10 kb) を pBluescript II SK(-) (TOYOBO 製) に挿入したターゲティングベクター (pBSK-mG34-K0neo) を作製する。pBSK-mG34-K0neo には薬物耐性遺伝子として neo (ネオマイシン耐性遺伝子) を mG34 の予測される GalNAc 転移活性領域である 7 番目から 9 番目の exon に導入する。その結果、mG34 の 7 番目から 9 番目の exon が欠失し、この部分が neo で置換され

る。こうして得られた pBSK-mG34-KOneo を制限酵素である NotI にて直鎖状とした後、80  $\mu$ g を ES 細胞 (E14 / 129Sv マウス由来) にトランスフェクション (エレクトロポレーション等) し、G418 耐性のコロニーを選択する。G418 耐性コロニーを 24 ウェルプレートに移し、培養を行う。細胞の一部を凍結保存した後、

5 残りの ES 細胞から DNA を抽出し、PCR により組み換えが起こっているクローンを 120 コロニー程度選択する。さらに、サザンブロッティング等により組み換えが予定通り起こっているかの確認を行い、最終的に組み換え体を 10 クローン程度選択する。選択したうちの 2 クローンの ES 細胞を C57BL/6 マウスの胚盤胞内に注入する。ES 細胞を注入したマウス胚を仮親マウスの子宮内へ移植して

10 キメラマウスを誕生させる。その後、ジャームトランスミッションによりヘテロノックアウトマウスを得ることができる。

## 請求の範囲

1. N-アセチル-D-ガラクトサミンをN-アセチル-D-グルコサミン  
に  $\beta$  1, 3 結合で転移する  $\beta$  1, 3-N-アセチル-D-ガラクトサミン転  
5 移酵素タンパク質。

2. 下記の性質 (a) - (c) :

(a) 受容体基質の特異性

オリゴ糖を受容体基質とする場合、Bz- $\beta$ -GlcNAc、GlcNAc- $\beta$  1-4-GlcNAc-  
 $\beta$ -Bz、Gal- $\beta$  1-3-(GlcNAc- $\beta$  1-6) GalNAc- $\alpha$ -pNp、GlcNAc- $\beta$  1-3-GalNAc-  
10  $\alpha$ -pNp、及び GlcNAc- $\beta$  1-6-GalNAc- $\alpha$ -pNp への転移活性を示す (「GlcNAc」  
はN-アセチル-D-グルコサミン残基を示し、「GalNAc」はN-アセチル  
-D-ガラクトサミン残基を示し、「Bz」はベンジル基を示し、「pNp」はパ  
ラニトロフェニル基を示し、「-」はグリコシド結合を示す。式中の数字は  
15 グリコシド結合が存在する糖環の炭素番号を示し、「 $\alpha$ 」及び「 $\beta$ 」は糖環  
1位のグリコシド結合のアノマーを示し、5位  $\text{CH}_2\text{OH}$  又は  $\text{CH}_3$  との位置関係が  
トランスのものを「 $\alpha$ 」、シスのものを「 $\beta$ 」で示す) ;

(b) 反応 pH

pH 6. 2 ~ 6. 6 の領域での活性が、他の pH 領域での活性と比較して  
低い ; 又は、(c) 二価イオンの要求性

20 前記活性は、少なくとも  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、又は  $\text{Mg}^{2+}$  の存在下で増強されるが、  
 $\text{Mn}^{2+}$  による活性の増強は  $\text{Cu}^+$  との共存下でほぼ完全に消失する ;

の少なくとも一つを有する、請求項 1 に記載の糖転移酵素タンパク質。

3. 下記 (A) 又は (B) のポリペプチドを含む糖転移酵素タンパク質

(A) 配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド ; 又は

25 (B) 配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個の  
アミノ酸が置換、欠失、又は挿入したアミノ酸配列を有し、且つN-アセチ  
ル-D-ガラクトサミンをN-アセチル-D-グルコサミンに  $\beta$  1, 3 結合  
で転移するポリペプチド。

4. 前記 (A) のポリペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸番号 189 ~ 500 のアミノ酸配列を有するポリペプチドからなる、請求項 3 に記載の糖転移酵素タンパク質。
5. 前記 (A) のポリペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸番号 36 ~ 500 のアミノ酸配列を有するポリペプチドからなる、請求項 3 に記載の糖転移酵素タンパク質。
6. 配列番号 2 に記載のアミノ酸番号 189 ~ 500 又は配列番号 4 に記載のアミノ酸番号 35 ~ 504 のアミノ酸配列と少なくとも 30 % を超える同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドからなる、請求項 3 に記載の糖転移酵素タンパク質。
7. 請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる核酸。
8. 配列番号 1 又は 3 に記載の塩基配列又は、少なくともその何れかに相補的な塩基配列からなる、請求項 7 に記載の核酸。
9. 配列番号 1 に記載の塩基番号 565 ~ 1503 の塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる、請求項 7 に記載の核酸。
10. 配列番号 1 に記載の塩基番号 106 ~ 1503 の塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる、請求項 7 に記載の核酸。
11. 配列番号 3 に記載の塩基番号 103 ~ 1512 の塩基配列又はそれに相補的な塩基配列からなる、請求項 7 に記載の核酸。
12. DNA であることを特徴とする、請求項 7 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸。
13. 請求項 7 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の核酸を含むベクター。
14. 請求項 13 に記載のベクターを含む形質転換体。
15.  $\beta$  1, 3-N-アセチル-D-ガラクトサミン転移酵素タンパク質の製造方法であって、請求項 14 に記載の形質転換体を生育させ、前記糖転移酵素タンパク質を発現させ、該形質転換体から該糖転移酵素タンパク質を回収することを含む製造方法。

16. 請求項1～6のいずれか1項に記載の $\beta$ 1,3-N-アセチル-D-ガラクトサミン転移酵素タンパク質を認識する抗体。

## 要約書

5 本発明のN-アセチル-D-ガラクトサミン転移酵素タンパク質は、N-アセチル-D-ガラクトサミンをN-アセチル-D-グルコサミンに  $\beta$  1, 3 結合で転移することを特徴とし、好ましくは配列番号 2 又は 4 に記載のアミノ酸配列を有する。本発明による癌化検定方法は、配列番号 1 又は 3 に記載の塩基配列、又は少なくともその一方に相補的な塩基配列に対し、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする測定用核酸を利用する。

図1

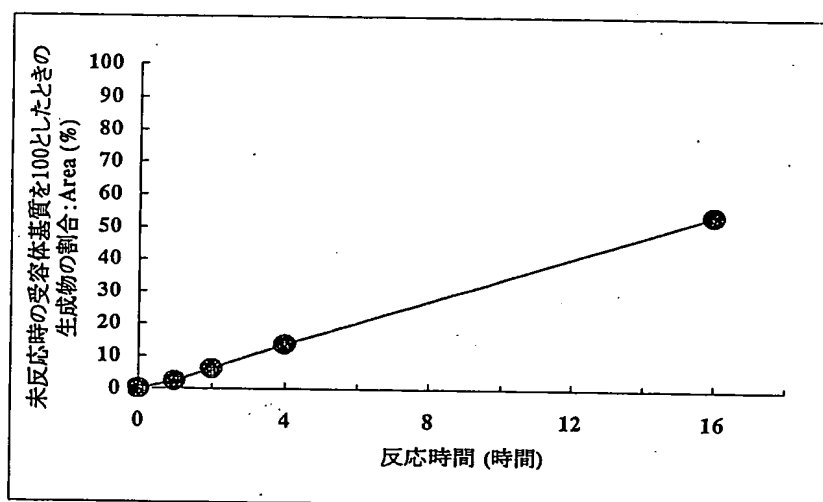
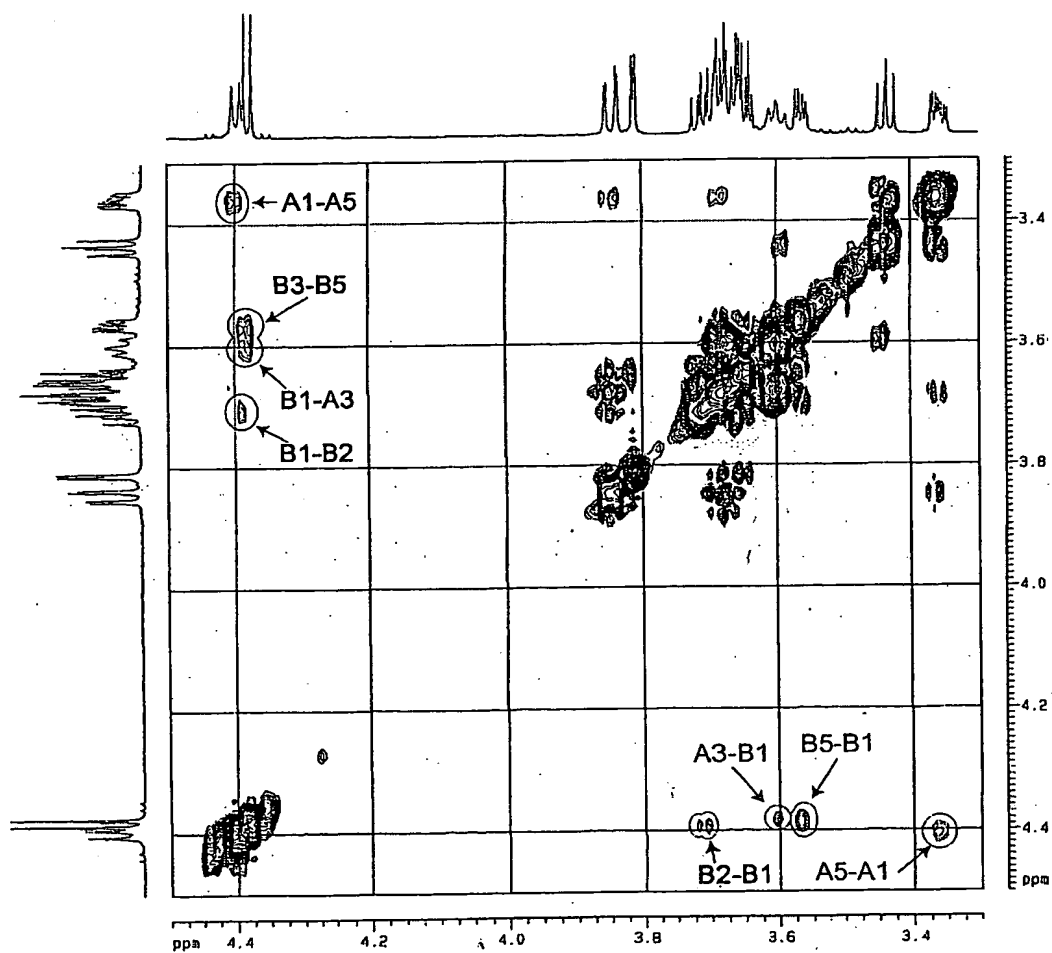


图 2 A





## 図 2 A (続き)

G34, noesyprtp, 0.9s, 298K, 03-01-09

## Current Data Parameters

NAME G34  
EXPNO 9  
PROCNO 1

## F2 - Acquisition Parameters

Date\_ 20021228  
Time 12.12  
INSTRUM dm750  
PROBHD 5 mm 1H XYZ-  
PULPROG noesyprtp  
TD 2048  
SOLVENT D2O  
NS 16  
DS 16  
SWH 6009.615 Hz  
FIDRES 2.934382 Hz  
AG 0.1704436 sec  
RG 2048  
DW 83.200 usec  
DE 4.50 usec  
TE 300.0 K  
d0 0.00000300 sec  
D1 1.39999998 sec  
D8 0.89999998 sec  
d11 0.03000000 sec  
d12 0.00002000 sec  
d13 0.00000300 sec  
IN0 0.00008331 sec

## \*\*\*\*\* CHANNEL f1 \*\*\*\*\*

NUC1 1H  
P1 8.65 usec  
PL1 1.00 dB  
PL9 75.00 dB  
SF01 750.1335265 MHz

## F1 - Acquisition parameters

NDO 2  
TD 512  
SF01 750.1335 MHz  
FIDRES 11.721681 Hz  
SW 8.001 ppm

## F2 - Processing parameters

SI 1024  
SF 750.1299973 MHz  
WOW QSINE  
SSB 2  
LB 0.00 Hz  
GB 0  
PC 1.00

## F1 - Processing parameters

SI 1024  
WC2 TPPI  
SF 750.1299974 MHz  
WOW QSINE  
SSB 2  
LB 0.00 Hz  
GB 0

## 2D NMR plot parameters

CX2 15.00 cm  
CX1 15.00 cm  
F2PLO 4.500 ppm  
F2LO 3375.58 Hz  
F2PHI 3.300 ppm  
F2HI 2475.43 Hz  
F1PLO 4.500 ppm  
F1LO 3375.58 Hz  
F1PHI 3.300 ppm  
F1HI 2475.43 Hz  
F2PPNCN 0.08000 ppm/cm  
F2HZCN 60.01040 Hz/cm  
F1PPNCN 0.08000 ppm/cm  
F1HZCN 30.01040 Hz/cm

图 2 B

NOESY mixing time 900ms

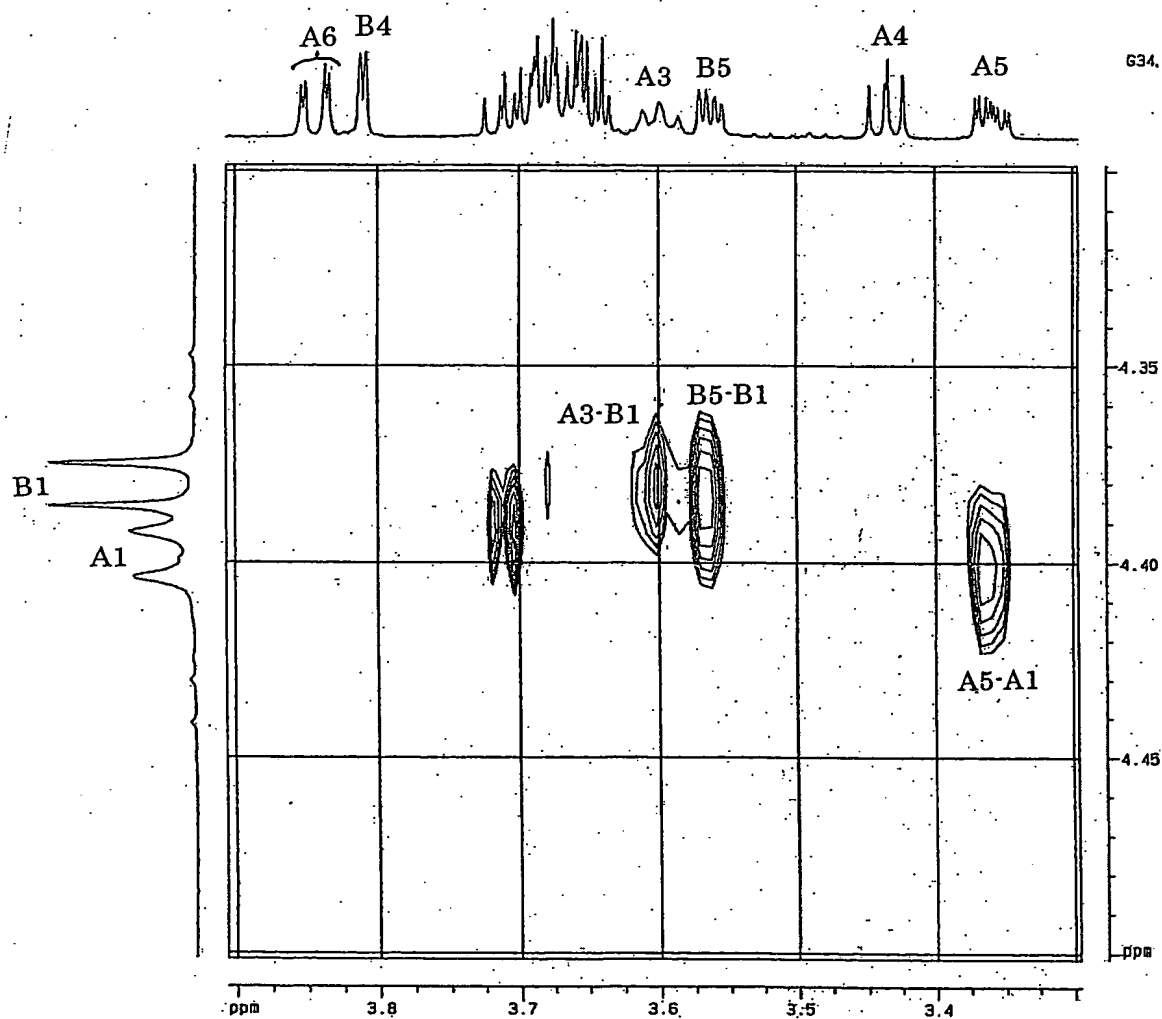


図 2 B (続き)

10/539450

G34, noesyprtp, 0.9s, 298K, 03-01-09

Current Data Parameters  
NAME G34  
EXPNO 9  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20021228  
Time 12.12  
INSTRUN dmx750  
PROBHD 5 mm 1H XYZ-  
PULPROG noesyprtp  
TD 2048  
SOLVENT D2O  
NS 16  
DS 16  
SWH 6009.615 Hz  
FIDRES 2.934382 Hz  
AG 0.1704436 sec  
RG 2048  
DW 83.200 usec  
DE 4.50 usec  
TE 300.0 K  
d0 0.0000300 sec  
D1 1.39999998 sec  
D8 0.89999998 sec  
d11 0.03000000 sec  
d12 0.00002000 sec  
d13 0.0000300 sec  
INO 0.00008331 sec

\*\*\*\*\* CHANNEL f1 \*\*\*\*\*

NUC1 1H  
P1 8.65 usec  
PL1 1.00 dB  
PL9 75.00 dB  
SF01 750.1335265 MHz

F1 - Acquisition parameters  
ND0 2  
TD 512  
SF01 750.1335 MHz  
FIDRES 11.721681 Hz  
SW 8.001 ppm

F2 - Processing parameters  
SI 1024  
SF 750.1299973 MHz  
WOW QSINE  
SSB 2  
LB 0.00 Hz  
GB 0  
PC 1.00

F1 - Processing parameters  
SI 1024  
WC2 TPPI  
SF 750.1299974 MHz  
WOW QSINE  
SSB 2  
LB 0.00 Hz  
GB 0

2D NMR plot parameters  
CX2 15.00 cm  
CX1 15.00 cm  
F2PLO 3.907 ppm  
F2LO 2930.51 Hz  
F2PHI 3.296 ppm  
F2HI 2472.75 Hz  
F1PLO 4.501 ppm  
F1LO 3376.70 Hz  
F1PHI 4.298 ppm  
F1HI 3224.32 Hz  
F2PPNCN 0.04068 ppm/cm  
F2HZCN 30.51759 Hz/cm  
F1PPNCN 0.01354 ppm/cm  
F1HZCN 10.15880 Hz/cm

図 3

テーブル 1

1 H化学シフト	A (ppm)	B (ppm)
$\delta 1$	4.398*	4.381*
$\delta 2$	3.687	3.711*
$\delta 3$	3.599*	3.655
$\delta 4$	3.435*	3.811*
$\delta 5$	3.358*	3.562*
$\delta 6$	3.681	3.645
$\delta 6$	3.844*	3.698
$\delta \text{CH}_3$	1.828*	1.892*

テーブル 2

結合係数	A (Hz)	B (Hz)
J12	8.4	8.4
J23	9.8	10.6
J34	8.6	5.9
J45	9.2	3.3?
J56a	5.8	5.5
J56b	2.2	4.0
J6a6b	12.4	12.1

図 4

テーブル 3

f2	信号	f1	信号	300 ms	600 ms	900 ms
7.265	フェニル	1.828	CH <sub>3</sub>	-	w	w
7.265	フェニル	4.557	CH <sub>2</sub> (高)	w	m	m
7.265	フェニル	4.778	CH <sub>2</sub> (低)	w	m	m
7.265	フェニル	4.398	A1	-	-	m
4.557	CH <sub>2</sub>	4.398	A1	-	w	m
4.398	A1	4.557	CH <sub>2</sub>	-	w	w
4.398	A1	3.358	A5	-	m	m
4.381	B1	3.599	A3	-	w	m
4.381	B1	3.562	B5	-	m	m
3.599	A3	4.381	B1	-	w	m
3.562	B5	4.381	B1	-	m	s
3.358	A5	4.398	A1	-	m	m

图 5

β3Gal-T1	1: FLVILISTTHKEFDARQAI RETWGDENNFKGIK-IA-T-LFLLG---KNAD--PVL----	48
β3Gal-T2	1: FLILLIAAEPGOIEARRAIRQTWGNESLAPGIQ-IT-R-IFLLGLSIKLN---GYL----	50
β3Gal-T3	1: FLVILVTSHPSDVKAQRAIRVTWGEKKSWWGYE-VL-T-IFLLGQEA EKED--KML----	51
β3Gal-T5	1: FLVLLVTSSHKQLAERMAIRQTWGERMVKGKQ-LK-T-IFLLGTTSSAAE--T-----	49
β3Gal-T6	1: FLAVLVASAPRAAERRSVIRSTWLARRGAPGD--VWAR--FAVGITAGLGAE--ER-----	49
G34	1: DVVVGVL SARNNHRLRVIRSTWMRHLLQHPTLSQRVLVKFIIGAHGCEVPVEDREDPYS 60	60
	* * * * * M 1	
β3Gal-T1	49: -N-----	49
β3Gal-T2	51: -Q-----	51
β3Gal-T3	52: -A-----	52
β3Gal-T5	50: -----	50
β3Gal-T6	50: -----	50
G34	61: CKLLNITNPVLNQEI EAFSLSEDTS SGLPEDRVVSVSFRVLYPIVITSLGVFYDANDVGF 120	120
β3Gal-T1	50: -----	50
β3Gal-T2	52: -----	52
β3Gal-T3	53: -----	53
β3Gal-T5	50: -----	50
β3Gal-T6	50: -----	50
G34	121: QRNITVKLYQAEQEEALFIARFSPSCGVQVNKLWYKPVEQF ILPESFEGTIVWESQDLH 180	180
β3Gal-T1	50: -----	50
β3Gal-T2	52: -----	52
β3Gal-T3	53: -----	53
β3Gal-T5	50: -----	50
β3Gal-T6	50: -----	50
G34	181: GLVSRNLHKVTVNDGGGVL RVITAGEGALPHEFLEGVEGVAGGFIYTIQEGDALLHNLHS 240	240
β3Gal-T1	50: -----QMEQESQIFHDIIVE-DFIDSYHNLTLKTLGMGRVWATFCSKA 92	92
β3Gal-T2	52: -----RAILEESRQYHDI IQQ-EYLDITYNLTIKTLMGMNWVATYCPHI 94	94
β3Gal-T3	53: -----LSLEDEHLLYGDIIRO-DFLDITYNLTIKTLMGFRWVTEFCPNA 95	95
β3Gal-T5	50: -----KEVDQESQRHGDIIQK-DFLDVYYNLTIKTLMGIEWVHRFCPOA 92	92
β3Gal-T6	50: -----RALEREQARHGDL LLLPALRDAYENLTAKVLAMLAWLDEHVAF- 92	92
G34	241: RPQRLIDHIRNLHEEDALLKEESSIYDDIVFV-DVVDITYRNVPKLLNFYRWTVETTSFN 299	299
	* * * * * M 2	
β3Gal-T1	93: KYVMKTDSDFVNMDNLIYKLLKPSTKPRRRYFTGYVINGG--P-IRDVRSKWYMPDL 148	148
β3Gal-T2	95: HYVMKTDSDFVNTEYL INKLLKPDLP PRHNYFTGYLMRGYA--P-NRNDKSKWYMPDL 151	151
β3Gal-T3	96: KYVMKTDTDFVINTGNLVKYLNLNHSEKF--FTGYPLIDNY--S-YRGFYQKTHISYQE 150	150
β3Gal-T5	93: AFVMKTDSDFINVDYLT ELLKKNRTRF--FTGFLKLNFE--P-IRQPFKWFVSKSE 147	147
β3Gal-T6	93: EFVLKADDDSPARLDALLAELRAREPARRRRLYWGFFSGRGRVKPGGRWREAAWQLCD-- 150	150
G34	300: LLLKTDDDCYIDLEAVFNRI VQKNLDGPNF--WWGNFRLNWAV--DRT--GKWQEL--E 350	350
	* * * * * M 3	
β3Gal-T1	149: YPDSNYPF-CSGTGYIFSADVAELIYKTSLHTRLLHLEDVYVGLCLRKLGIHPFQNSG 206	206
β3Gal-T2	152: YPSERYPVF-CSGTGYVFSGD LAEKIFKVSLGIRRLHLEDVYVGLCLAKLRIDPVPPPNE 210	210
β3Gal-T3	151: YPFKVFPPY-CSGLGYIMSRDLVPRIYEMMGHVKPIKFEDVYVGLCLNLLKVNHIHEDT 209	209
β3Gal-T5	148: YPWDRYPF-CSGTGYVFSGDVASQVYNVSKSVPIKLEDVYVGLCLERLNLIRLEELHSQ 206	206
β3Gal-T6	151: YYL--PYAL--GGGYVLSADLVHRLSRDYLRAWHSEDSVSLGAWLA--PVDVQREHD- 202	202
G34	351: YPSPAYPAFAC-GSGYVISKDIVKWLASNSGRLKTYQGEDVSMGI NMAAIGPKRYQD-SL 408	408
	* * * * * M 3	
β3Gal-T1	207: --FNHWKMAYSLCRYRRVITVHQISPEEMHRIWNDMSKKHLRC----- 248	248
β3Gal-T2	211: FVFNHWVRSYSSCKYSHLITSHQFOPSELIKYWNHLQONKHACANA AKEKA----- 262	262
β3Gal-T3	210: NLFFLYRIHLDVCQLRRVIAAHGFSKKEIITFWQVMLRN--TTCHY----- 253	253
β3Gal-T5	207: PTFPPGGLRFSVCLFRRIVACHFIKPTLLDYQALENSRGEDCP-PV----- 253	253
β3Gal-T6	203: PRFDTE-YRSRGCSNQYL VTHKQ-SLEDMLEKHATL-AREGLCKREVQLRLSYVYDWSA 259	259
G34	409: -----WLC-EKTCETGMLSSP-QYSPWELTELWK-LKERC GDPC-RC-QAR----- 449	449
	* * * * *	
β3Gal-T1	249: -----	249
β3Gal-T2	263: ---GRYRHRKLH-----	271
β3Gal-T3	254: -----	254
β3Gal-T5	254: -----	254
β3Gal-T6	260: PPSQCCQR-REGIP-----	272
G34	450: -----	450

図 6

	M 1
b3GnT2	FLLLAIKSLTPHFARRQAIRESWGQES-NAGNQT---VVRVFLLGQTPPEDNHP-DLSDM
b3GnT3	FLLLVIKSSPSNYVRRELLRRTWGRER-KVRGLQ---LRLLFLVGTASNPEAR-KVNR
b3GnT4	FLLLAIKSPQGHVERRAIRSTWGRVGGWARGRQ---LKLVLFLGVAG---SA-PPAQL
b3GnT5	LLLLFVKTAPENYDRRS GIRRTWGNEN-YVRSQNLNANIKTLFALGTPNPLE-GE-ELQRK
b3Gal-T6	FLAVLVASAPRAVERRTAVRSTWLAPE-RRGGPED---VWARFAVGTGGLGS---EERRA
hGal-T1	FLVILISTTHKEFDARQAIRETWGDEN-NFKGIK---IATLFLLGKNADP---VLNQ
hGal-T2	FLILLIAAEPGGIEARRAIRQTWGNES-LAPGIQ---ITRIFLLGLSIKLN--G-YLQRA
hGal-T3	FLVILVTSHPSDVKARQAIRVTWGEKK-SWWGYE---VLTFFLLGQEAKE-DK-MLALS
hGal-T4	FLLLILCTAPENLNQRNATRASWGGLR-EARGLR---VQTLFLLGEPNAQHPVWGSQGS
hGal-T5	FLVLLVTSSHKQLAERMAIRQTWGER-MVKGKQ---LKTFFLLGTTSSA---AETKE
	* * *
	M 2
b3GnT2	LKFESEKHQDILMW-NYRDTFFNLSLKEVLFLRWVSTSCPDTEFVFKGDDDFVNTHHIL
b3GnT3	LELEAQTHGDILQW-DFHDSFFNLTQLKQVLFLQWQETRCANAS FVLNGDDDFVHTDNMV
b3GnT4	LAYESREFDDILQW-DFTEDFNLTLELHLQRVVAACPAHFMLKGDDDFVHVPNVL
b3GnT5	LAWEDQRYNDIIQQ-DFVDSFYNLTLKLLMQFSWANTYCPHAFMLTADDDFIHMPNLI
b3Gal-T6	LELEQAQHGDLALLPALRDAYENLTAKVLAMLTWLDER-VDFEVLKADDDFARLDAIL
hGal-T1	VEQESQIFHDIIVE-DFIDSYHNLTLKTMGMWVATFCSKAKYVMKTDSDFVNMDNLI
hGal-T2	ILEESRQYHDIIQQ-EYLDITYNLTIKTMGMWVATYCPHIFVVMKTDSDFVNTEYLI
hGal-T3	LEDEHLLYGDIIQ-DFLDTYNNLTLEKIMAFRWVTEFCPNAKYVMKTDDDFINTGNLV
hGal-T4	LASESAAQGDILQA-AFQDSYRNLTLKTLSGLNWAEKHCPMARYVLKTDDDFVNVPELV
hGal-T5	VDQESQRHGDIIQK-DFLDVYYNLTLKTMGIEWVHRFCQAAEVVMKTDSDFINVDTLT
	* * *
b3GnT2	NYLNS-----LSKTKAKDLFIGDVIHNAOPHRDKKLKYYI
b3GnT3	FYLQD-----HDP--GRHLFVGQLIQNVGPIRAFWSKYYV
b3GnT4	EFLDG-----WDP--AQDLLVGDVIRQALPNRNTKVYFI
b3GnT5	EYLQS-----LEQIGVQDFWIGRVRHGAPPIRDKSSKYYV
b3Gal-T6	VDLRA-----REPARRRLYWGFFSGR--GRVKPGGRWRE
hGal-T1	YKLLK-----PSTKPRRRYFTGYVING-GPIRDVRSKWYM
hGal-T2	NKLLK-----PDLPPRHHYFTGYLMRGYAPNRNKDSKWYM
hGal-T3	KYLLN-----LNH--SEKFFTGYPLIDNYSYRGFYQKTHI
hGal-T4	SELVLRGGRWQWERSTEPQREAEQEGQVLHSEEVPLLYLGRVHWRVNPSTPGGRHRV
hGal-T5	ELLLK-----KNR--TTRFFTGLKLNEFPRIQPFKSWFV
	* * *
	M 3
b3GnT2	PEVVYSG---LYPPYAGGGGFLYSGHIALRLYHITDQVH-LYPIDDVYTGMLQKGLVP
b3GnT3	PEVVTQNE--RYPPYCGGGGFLSRFTAAALRRAHVLD-IFPIDDVFLGMLLEGLKP
b3GnT4	PPSMYRAT--HYPPYAGGGGYVMSRATVRRLLQAIMEDAE-LFPIDDVFGMLRRLGLSP
b3GnT5	SYEMYQWP--AYPDYTAGAAYVISGDVAAKVYEASQTLNSSLYIDVFMGLCANKIGIVP
b3Gal-T6	AAWQLCD---YYLPYALGGGYVLSADLVHYLRSLREYLR-AWHSEVSLGTWLPVDVQR
hGal-T1	PRDLYPD--NYPPFCSGTGYIFSADVAELIYKTSLHTR-LLHLEDVYVGLCLRLGIHP
hGal-T2	PPDLYPSE--RYPVFCSGTGYVFSGDLAEKIFKVS LGIR-RLHLEDVYVGLCLAKLRIDP
hGal-T3	SYQEYPFK--VFPPYCSGLGYIMSRDLVPRIYEMMGHVK-PIKFEDVYVGLCLNLLKVINI
hGal-T4	SEEQWPHTWGPPPYASGTGYVLSASAVQLILKVASRAP-LLPLEDVFGVSARRGGLAP
hGal-T5	SKSEYPWD--RYPPFCSGTGYVFSGDVASQVYNVSKVSP-YIKLEDVFGVGLCLERLNIRL
	* * *
b3GnT2	EKHKGFRFTDIE----EKNKNNICSYVDLMLVHSRKPQEMIDIWSQLQSA-----
b3GnT3	ASHSGIRTSQVRAPSQLSSFDPCFYRDLVLRFLPYEMLLMWDALNQP-----
b3GnT4	MHHAGFKTFGIRR---PLDPLDCLYRGLLLVHRLSPLEMTMWALVTDE-----
b3GnT5	QDHVFFS--GEGK-----TPYHPCIEYKMTSHG-HLEDLQDLWKNATDPKVKTKSGFF
b3Gal-T6	EHDPRFD--TEYK-----SRGCNNQYLVTHKQ-SPEDMLEKQMLLHEG-----

注記:「b3」は、β 1, 3 結合を示し、「Gn」は GlcNAc を示す-

图 7

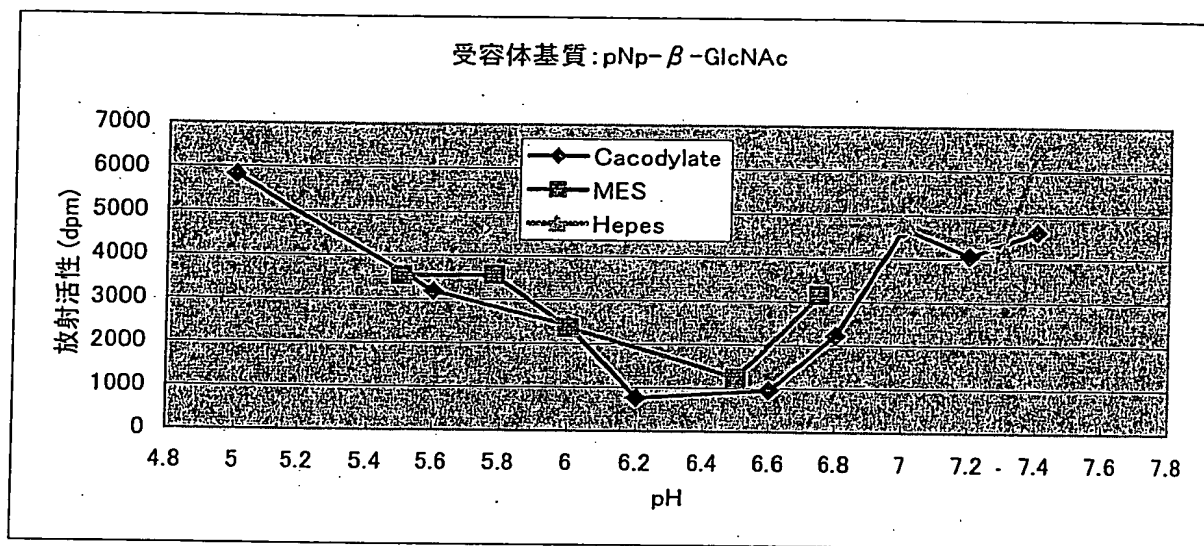


图 8

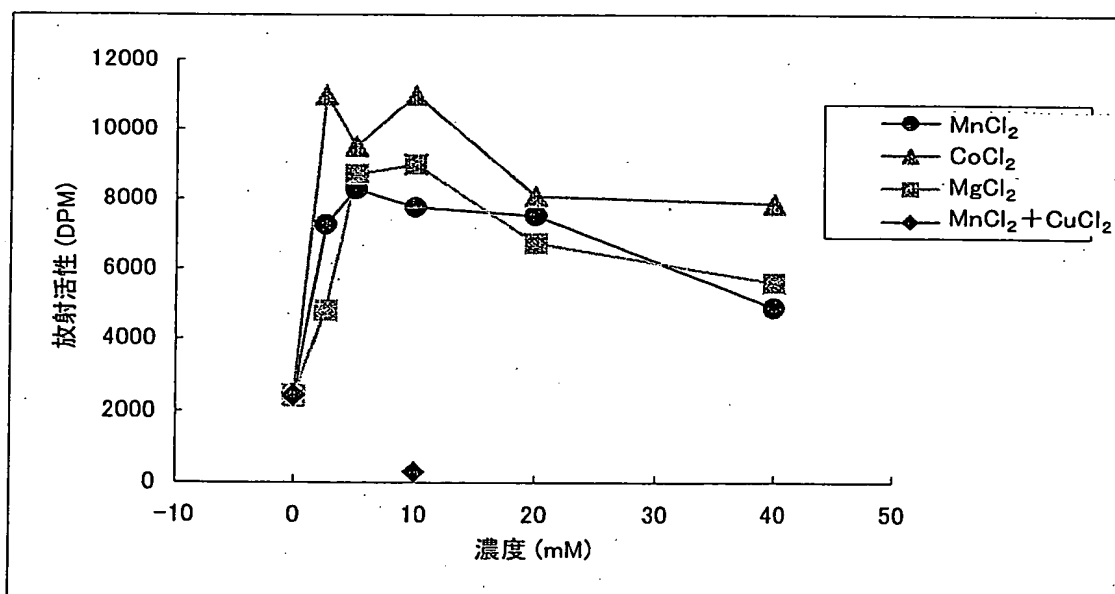




図9

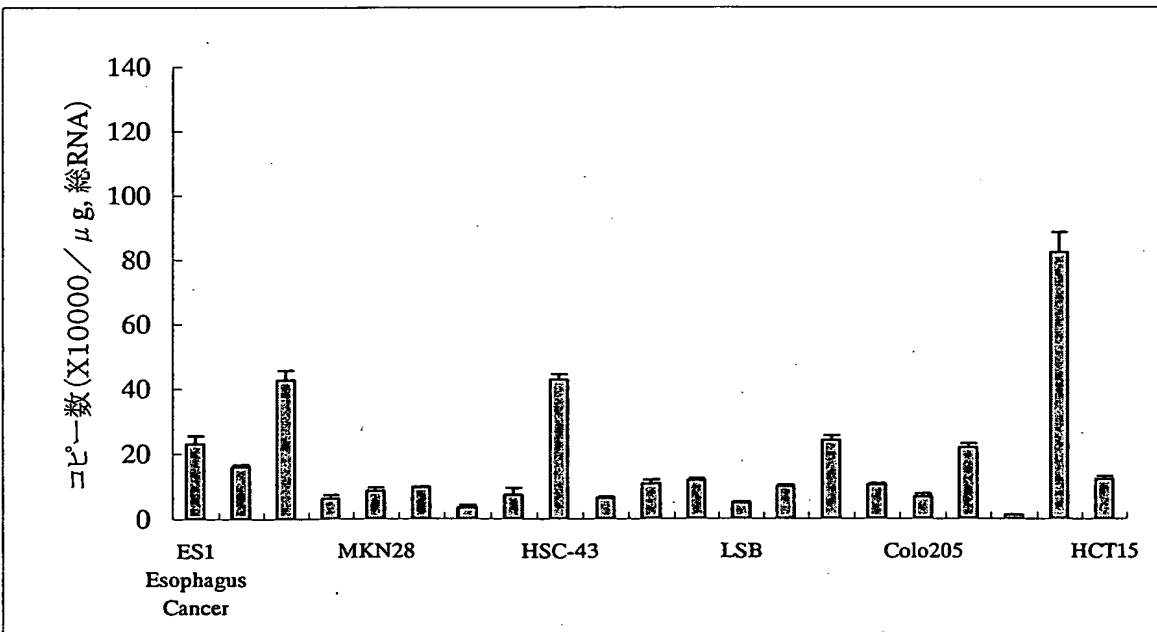
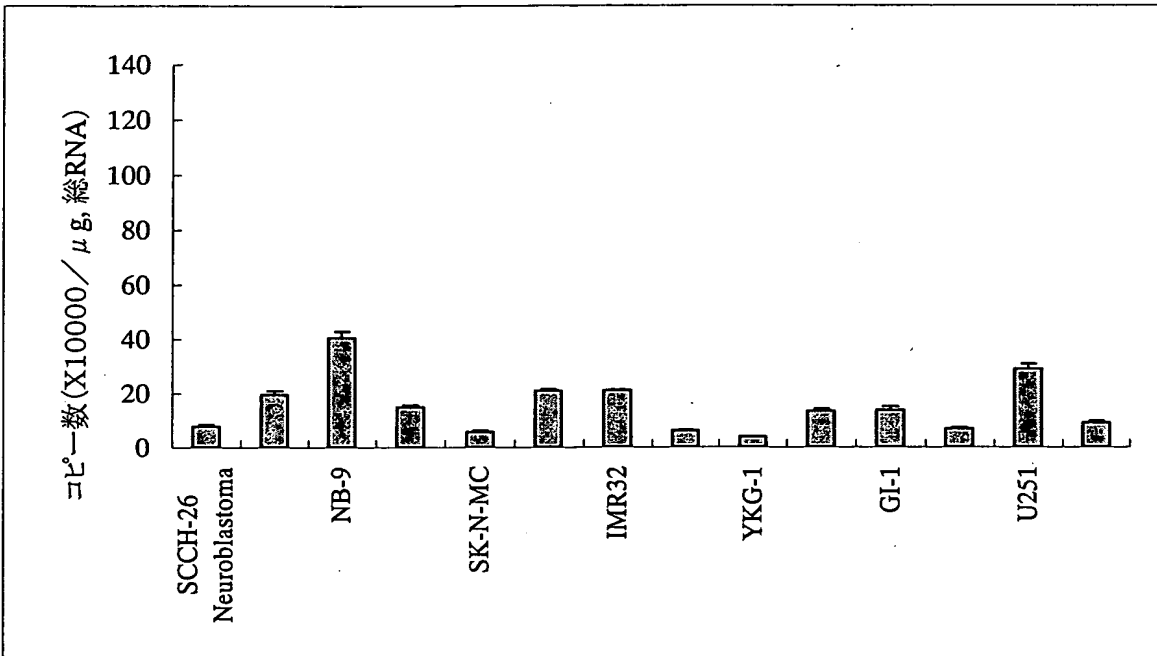


図9(続き)

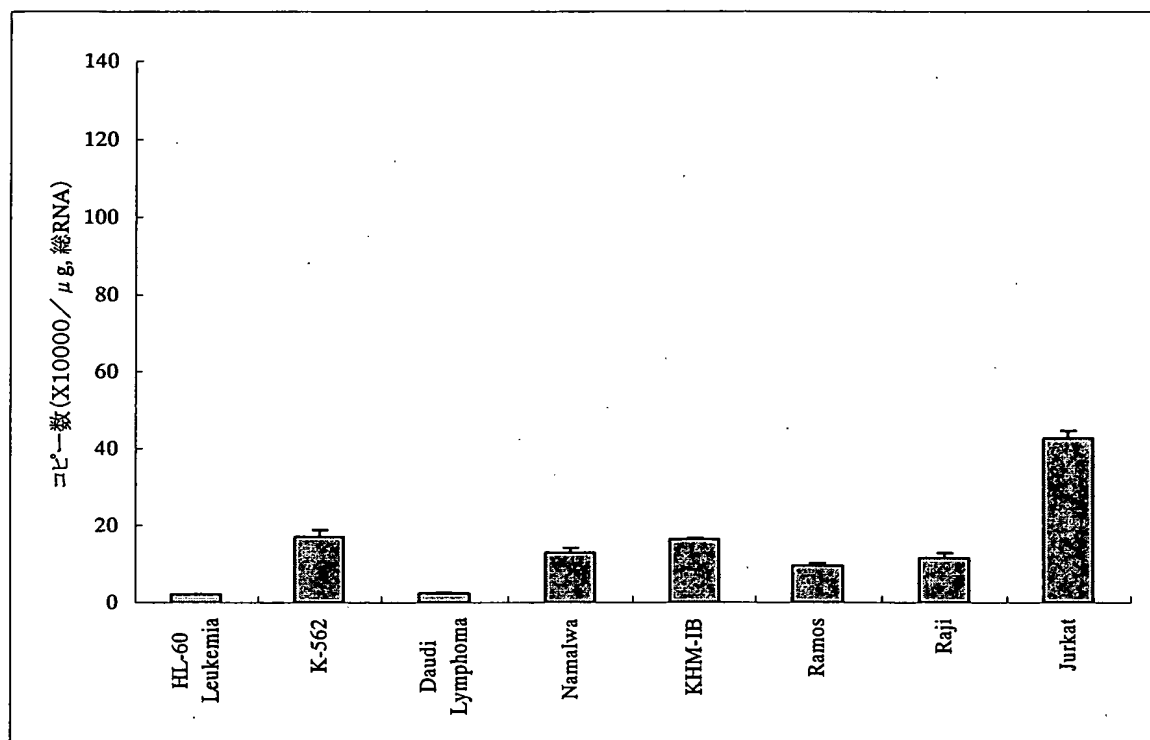


図9(続き)

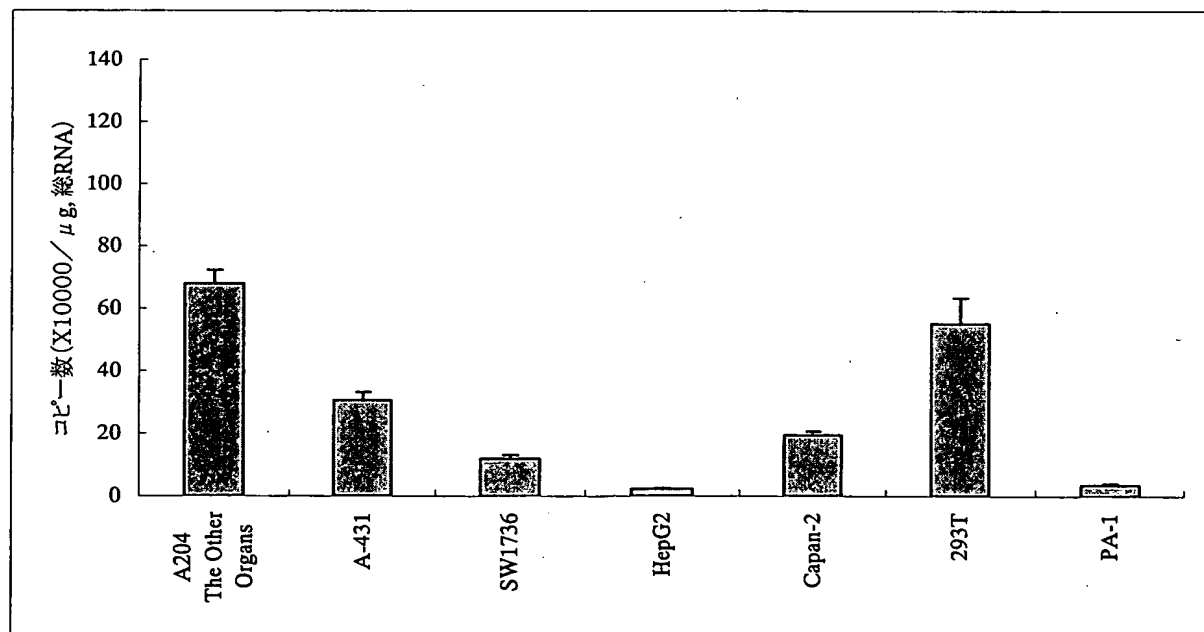
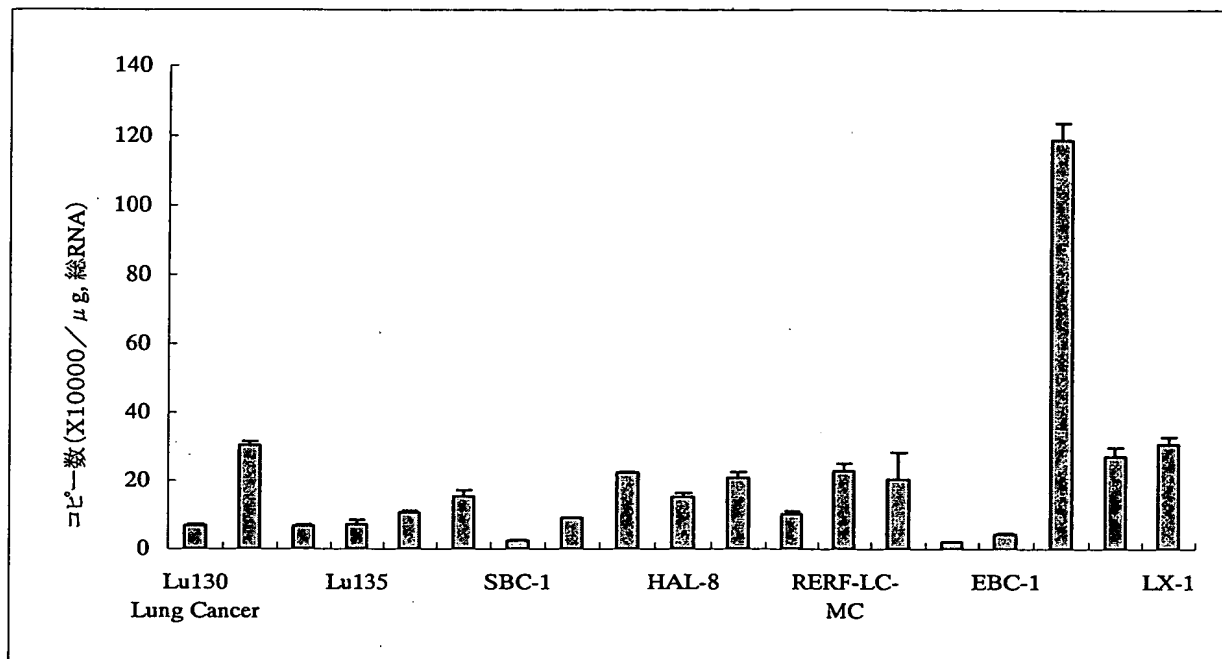


図9(続き)

	Cell Line	コピー数(X1000 O/μg, 総RNA)	
Neuroblastoma	SCCH-26	7.87	0.59
	NAGAI	19.53	1.45
	NB-9	40.56	2.34
	SK-N-SH	14.93	0.74
	SK-N-MC	5.79	0.47
	NB-1	20.90	0.54
	IMR32	21.03	0.25
Glioblastoma	T98G	6.20	0.24
	YKG-1	3.85	0.05
	A172	13.38	0.87
	GI-1	13.72	1.25
	U118MG	6.80	0.51
	U251	28.90	1.89
Lung Cancer	KG-1-C	9.09	0.55
	Lu130	6.80	0.42
	Lu134A	30.31	1.16
	Lu134B	6.76	0.40
	Lu135	7.16	1.32
	Lu139	10.66	0.50
	Lu140	15.36	1.83
	SBC-1	2.46	0.22
	PC-7	9.08	0.20
	PC-9	22.42	0.11
	HAL-8	15.18	1.22
	HAL-24	20.80	1.71
	ABC-1	10.27	0.87
	RERF-LC-MC	22.85	2.15
	EHHA-9	20.34	7.88
	PC-1	2.13	0.18
	EBC-1	4.41	0.19
	PC-10	118.76	4.89
	A549	27.10	2.63
	LX-1	30.72	2.06
Esophagus Cancer	ES1	23.03	2.53
	ES2	16.07	0.65
	ES6	42.76	2.96
Gastric Cancer	MKN1	6.20	1.10
	MKN28	8.56	0.99
	MKN7	9.71	0.10
	MKN74	3.46	0.81
	MKN-45	7.32	2.13
	HSC-43	42.82	1.67
	KATOIII	6.37	0.37
	TMK-1	10.78	1.19

Colorectal Cancer	LSC	11.76	0.57
	LSB	4.89	0.30
	SW480	10.05	0.43
	SW1116	24.09	1.39
	Colo201	10.40	0.41
	Colo205	6.80	0.88
	C1	21.86	1.20
	WiDr	1.24	0.04
The Other Organs	HCT8	82.17	6.24
	HCT15	12.14	0.96
	A204	67.94	4.37
	A-431	30.59	2.52
	SW1736	11.92	1.13
	HepG2	2.27	0.35
Leukemia	Capan-2	19.43	1.24
	293T	55.14	8.29
	PA-1	3.52	0.56
Lymphoma	HL-60	2.08	0.11
	K-562	17.08	1.77
	Daudi	2.41	0.20
	Namalwa	13.00	1.20
	KHM-IB	16.35	0.45
	Ramos	9.54	0.75
	Raji	11.56	1.31
	Jurkat	42.71	1.93
	YKN45	10.12	0.56

マウス G34 1' MRNWLVLCP CVLGAALHLW HLWLRSPDP HNTGPSAADQ SALFPHWKFS HYDVVVGVL  
 ヒト G34 1" MRNWLVLCP CVLGAALHLW -LRLRSPPA CASGAGPADQ LALFPQWKST HYDVVVGVL

61' ARNNHELNRV IRNTWLKNLL HHPTLSQRVL VKFIIGARGC EVEVEDREDP YSCRLLNITN  
 60" ARNNHELNRV IRSTWMRHLL QHPTLSQRVL VKFIIGAHGC EVEVEDREDP YSCKLLNITN

121' PVLNQIEAF SFPEDASSR LSEDRVSVS FRVLYPIVIT SLGVFYDASD VGFQRNITVK  
 120" PVLNQIEAF SLSEDTSRG- LPEDRVSVS FRVLYPIVIT SLGVFYDAND VGFQRNITVK

181' LYQTEQEEAL FIARFSPSC GVQVKNLWYK PVEQFILPES FEGTIVWESQ DLHGLVSRNL  
 179" LYQAEQEEAL FIARFSPSC GVQVKNLWYK PVEQFILPES FEGTIVWESQ DLHGLVSRNL

241' HRVTVNDGGG VLRVLAAGEG ALPHEFMGV EGVAGGFIYT VQEGDALLRS LYSRPQRLAD  
 239" HKVTVNDGGG VLRVITAGEG ALPHEFLEGV EGVAGGFIYT IQEGDALLHN LHSRPQRLID

301' HIQDLQVEDA LLQEESVHD DIVFVDVVDY YRNVPKLLN FYRWTVESTS FDLLLKTDDD  
 299" HIRNLHEEDA LLKEESSIYD DIVFVDVVDY YRNVEAKLLN FYRWTVETTS FNLLLKTDDD

361' CYIDLEAVFN RIAQKNLDGP NFWWGNFRIN WAVDRITGKWQ ELEYPSPAYP AFACGSGYVI  
 359" CYIDLEAVFN RIVQKNLDGP NFWWGNFRIN WAVDRITGKWQ ELEYPSPAYP AFACGSGYVI

421' SKDIVDWLAG NSRRLKTYQG EDVSMGIWMA AIGPKRHQDS LNLCEKTCET GMLSSPOQSP  
 419" SKDIVKWLAS NSGRLLKTYQG EDVSMGIWMA AIGPKRYQDS LNLCEKTCET GMLSSPOQSP

481' EELSKLWELK ELCGDPCQCE AKVR  
 479" WELTELWKLK ERCGDPCRCQ AR

图 1 1

